



Pedro Miguel da Costa Amaral Pinto Citotoxicidade e Genotoxicidade do Sulforafano em Osteosarcoma Humano



Pedro Miguel da Costa Amaral Pinto Citotoxicidade e Genotoxicidade do Sulforafano em Osteosarcoma Humano

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Aplicada, ramo de Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica da Dra. Helena Cristina Correia de Oliveira, Pós-Doutoranda do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro e sob co-orientação científica da Professora Doutora Conceição Santos, Professora associada com agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

Dedico este trabalho à minha Mãe ao meu Pai à minha Irmã e à minha Namorada. Obrigado por todo o vosso apoio.

o júri

Presidente

Prof. Dr. João António de Almeida Serôdio
professor auxiliar do departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Arguente Principal

Dra. Susana Gomes dos Santos
Investigadora Auxiliar do Instituto de Engenharia Biomédica (INEB) do Porto

Orientadora

Dra. Helena Cristina Correia de Oliveira
Investigadora Pós-Doutoramento, CESAM - Centro de Estudos do Ambiente e do Mar da Universidade de Aveiro

Co-Orientadora

Prof. Dra. Maria Da Conceição Lopes Vieira dos Santos
professora Associada com Agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

agradecimentos

A realização do meu trabalho final de curso não teria sido possível sem o apoio incondicional dos meus pais e da minha irmã, aos quais quero deixar o meu agradecimento.

Quero agradecer a toda a equipa do Laboratório de Biotecnologia e Citómica, principalmente à professora Conceição uma vez que me permitiu realizar a minha tese de mestrado.

Quero também agradecer aos meus colegas de estágio, pois estivemos sempre unidos e sempre nos ajudámos uns aos outros, o que contribuiu para uma melhor aprendizagem. Ao Tiago Pedrosa e ao Francisco Pinho muito obrigado por tudo.

A todos os meus amigos que sempre me ajudaram e incentivaram nos momentos mais difíceis.

A toda a minha família e a todos os meus amigos que não foram mencionados.

À minha orientadora, Dra. Helena Oliveira, por toda a paciência e toda a ajuda que disponibilizou na conclusão deste trabalho.

palavras-chave

Sulforafano, ciclo celular, viabilidade celular, citotoxicidade, genotoxicidade, ensaio cometa.

resumo

Sulforafano (SFN) é o isotiocianato mais extensivamente estudado, com especial foco na sua atividade anti-tumoral e é encontrado principalmente em grande quantidade nos brócolos. Vários estudos têm demonstrado a capacidade do SFN em causar paragem do ciclo celular, embora, nas linhas de osteosarcoma, os efeitos do SFN sobre a proliferação celular e a progressão do ciclo celular estejam ainda pouco compreendidos.

O objetivo deste estudo foi investigar a capacidade do SFN em induzir a paragem do ciclo celular, o seu efeito na proliferação celular, bem como potenciais efeitos genotóxicos em linhas celulares humanas de osteosarcoma.

Para realizar este objetivo, as células MG-63 foram expostas a diferentes concentrações de SFN (5 e 10 μ M) em diferentes períodos (24 e 48h). O crescimento e morfologia celular foram observados diariamente usando um microscópio invertido. A viabilidade celular foi determinada usando o ensaio de redução metabólica MTT. O ciclo celular foi avaliado por citometria de fluxo. A avaliação de danos no DNA foi realizada pelo ensaio cometa.

Observou-se para ambos períodos de exposição que a maior concentração de SFN reduziu a viabilidade celular em cerca de 33% e 40%, relativamente ao controlo. A progressão do ciclo celular também foi afetada para a dose mais alta de SFN, verificando-se um aumento na percentagem de células na fase G2 para ambos os períodos. Da mesma forma, quanto maior a concentração de SFN maior a indução do aumento no dano no DNA. Por fim, estes resultados indicam que o SFN inibiu a proliferação e induziu paragem do ciclo celular e genotoxicidade em células de osteossarcoma humano.

keywords

Sulforaphane, cell cycle, cellular viability, cytotoxicity, genotoxicity, comet assay.

abstract

Sulforaphane (SFN) is the most extensively studied isothiocyanate, focused in its anti-tumoral activity and it is mainly found in great amounts in broccoli. Several studies have shown the ability of SFN to cause cell cycle arrest, however, regarding osteosarcoma cell lines, the effects of SFN on cell proliferation and cell cycle progression are still poorly understood.

The aim of this study was to investigate the effects of SFN on cell proliferation and its ability in inducing cell cycle arrest and genotoxicity in human osteosarcoma cell lines.

MG-63 cells were exposed to different concentrations of SFN (5 and 10 μ M) for different time periods (24 and 48h). Cell growth and morphology was daily observed using in an inverted microscope. Cell viability was determined using the MTT reduction assay. Cell cycle was evaluated by flow cytometry. Evaluation of DNA damage was performed by the comet assay.

For both periods of exposure, the highest SFN dose reduced cell viability in about 33% and 40% of the control. Cell cycle progression was also affected for the highest SFN dose, with an increase in the percentage of cells in the G2 phase. Similarly, the highest SFN dose induced an increase in DNA damage. At last our results indicate that SFN inhibited proliferation and induced cell cycle arrest and genotoxicity in human osteosarcoma cells.

ÍNDICE	I
ÍNDICE DE TABELAS	III
1. INTRODUÇÃO	2
1.1. O osteosarcoma e estudos pré-clínicos	2
1.1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O OSTEOSARCOMA	2
1.1.2. Linhas celulares de osteoblasto/osteosarcoma usadas em estudos <i>in vitro</i> : destaque para a Linha Celular MG 63	3
1.2. Isotiocianatos: compostos com potencial antitumoral	3
1.2.1. CARACTERIZAÇÃO GERAL	3
1.2.2. Sulforafano	7
1.3. Ensaios <i>in vivo</i> vs. <i>In vitro</i>	12
1.3.1. Ensaios <i>in vivo</i> : breves considerações	12
1.3.2. Ensaios de compostos <i>in vitro</i>	13
1.3.3. Citometria de fluxo (FCM)	14
1.3.4. Técnicas de avaliação de cito e /ou genotoxicidade	16
1.4. Objetivos desta dissertação	21
2. MATERIAL E MÉTODOS	23
2.1. Manutenção da cultura de células	23
2.2. Criopreservação das Células	24
2.3. Exposição a sulforafano	24
2.4. Ensaio MTT	24
2.5. Ciclo Celular	25
2.6. Ensaio Cometa	26
2.7. Análise Estatística	28

3.	RESULTADOS	29
3.1.	Avaliação citotóxica do Sulforafano em células MG-63	29
3.1.1.	Efeito do Sulforafano na proliferação celular e confluência das culturas	29
3.1.2.	Efeito do Sulforafano na viabilidade celular (Ensaio MTT)	30
3.1.3.	Efeito do sulforafano no ciclo celular (ensaio de citometria de fluxo)	31
3.2.	Avaliação dos efeitos genotóxicos do sulforafano em células MG-63	33
3.2.1.	Avaliação do ensaio cometa	33
4.	DISCUSSÃO	35
5.	CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS	42
6.	BIBLIOGRAFIA	43

Índice de Figuras

Figura 1 - Exemplo de vegetais pertencentes ao género <i>Brassica</i> . http://summertomato.com/tag/brassica/	4
Figura 2 - Hidrólise dos glucosinolatos. Fonte: Hayes et al, 2008	5
Figura 3 - Libertação de glucosinolatos no lúmen do intestino, absorção e metabolismo dos isotiocianatos e alguns locais possíveis de ação e vias de excreção. Fonte: Johnson, 2007..	6
Figura 5 - Quimioprevenção do cancro pelo sulforafano através da modulação de enzimas metabolizadoras. Fonte: Elbarbry et al, 2011	9
Figura 6 - Sulforafano induz a paragem do ciclo celular através da modulação de diferentes fases da progressão do ciclo celular. Fonte: Juge et al, 2007	11
Figura 7 - Representação esquemática de um citómetro de fluxo (retirado de Silva et al, 2004) ...	15
Figura 8 – Representação esquemática de uma câmara de fluxo.	16
Figura 9 - Esquema representativo do ciclo celular de eucariontes (reirado de http://www2.le.ac.uk/departments/genetics/cellcycle-mitosis-meiosis)	20
Figura 10 - Morfologia das células MG-63 controlo (0µM de sulforafano). Observação em microscópio invertido (ampliação 100x)	29
Figura 11 - Morfologia das células MG-63 expostas ao sulforafano a 5µM (ampliação 100x).....	29
Figura 12 - Morfologia das células MG-63 expostas ao sulforafano a 10µM (ampliação 100x).....	29
Figura 13 - Efeito do sulforafano na viabilidade das células MG-63 após 24 e 48 horas de exposição. Os valores representam a média ± S.D. O símbolo * indica diferenças significativas entre o controlo e as restantes amostras (p <0,001). Letras diferentes, a e b significam diferenças estatísticas significativas entre tempos (p <0,001).....	30
Figura 14 - Exemplos de histogamas obtidos após exposição ao sulforafano durante 48 horas. A - Controlo; B - 5µM; C - 10µM.....	31
Figura 15 - Resultado do ciclo celular, após (A) 24 e (B) 48 horas de exposição ao sulforafano. Os valores representam a média ± S.D. O símbolo * indica diferenças significativas entre o controlo e as restantes amostras (p <0,001).....	32
Figura 16 - Imagens do ensaio cometa obtidas após 48 horas de exposição ao sulforafano: A - Controlo; B - 5 µM; C - 10 µM. Ampliação: 1000x.....	33

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Dados do ensaio cometa após exposição de sulforafano para 48 horas: os valores representam a média ± S.D. O símbolo * significa que existem diferenças significativas (p <0,001).....	34
--	----

1. INTRODUÇÃO

1.1. O OSTEOSARCOMA E ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS

1.1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O OSTEOSARCOMA

Sendo um tecido vivo constantemente renovado, o tecido ósseo pode ser afetado por várias perturbações, de que se destacam os tumores. O osteosarcoma é particularmente importante pela sua incidência na população jovem.

Aproximadamente 1.500 novos casos de osteosarcoma são registados nos E.U.A por ano, sendo assim relativamente pouco frequentes, mas em contrapartida, apresentam elevada incidência em jovens e elevada taxa de mortalidade (entre 30-40% em pacientes não metastizados, e sobe para 80% em pacientes metastizados). Apesar de surgirem também em adultos (sobretudo em idosos), os osteosarcomas têm particular importância em população jovem (e.g. adolescentes) (Ta et al, 2009). Este tumor maligno tem frequentemente uma propagação rápida. O tumor ocorre preferencialmente em ossos longos (e.g. tíbias e fêmures) mas podem aparecer noutros ossos (vértebras, bacia, mandíbula) (Clarke et al 2008).

O tratamento inclui a quimioterapia e ressecção cirúrgica completa. Contrariamente, a radioterapia em geral tem pouca eficiência. Contudo, sendo altamente proliferativo e recalcitrante, usa-se frequentemente quimioterapia agressiva mesmo antes da cirurgia. Os agentes quimioterápicos atualmente usados passam por e.g. cisplatina, ifosfamida e metotrexato que possuem vários efeitos secundários (Ta et al, 2009).

Um dos maiores dramas da atualidade é o fato desta doença metastastizada não apresentar possibilidade de cura, em jovens pacientes (Ta et al, 2009). O desenvolvimento de novos compostos que tenham atividade antitumoral e que limitem a proliferação de osteosarcomas, é assim uma linha de investigação de extrema importância. Muitos destes estudos têm sido feitos *in vivo*, usando sobretudo ratinhos (Singh et al, 2004; Jones e Brooks 2006; Yoxall et al, 2005;) ou *in vitro* (Gamet-Payraastre et al 2000; Visanji et al, 2004; Karmakar

et al, 2006). Contudo, a pressão crescente para reduzir ensaios envolvendo animais, associada à dificuldade de transpor informação obtida com animais para o homem, leva a um crescente interesse por ensaios *in vitro* (usando sobretudo células/tecidos humanos em cultura) Este aspeto será mais aprofundado na secção 3.

1.1.2. Linhas celulares de osteoblasto/osteosarcoma usadas em estudos *in vitro*: destaque para a Linha Celular MG 63

Nos estudos *in vitro* sobre osteosarcomas, usam-se várias linhas celulares, sobretudo a MG-63 e a Saos-2 (Mohseny et al, 2011). A linha celular MG-63 (usada nesta dissertação) é caracterizada por ser uma linha celular derivada de osteosarcoma (tumor maligno humano). As células possuem uma morfologia de típica de fibroblastos e crescem em monocamada aderente. Estas células apresentam uma série de características típicas de um fenótipo de osteoblastos indiferenciados, incluindo a expressão de colagénio do tipo I e III, e uma baixa expressão basal de fosfatase alcalina (Pautke et al, 2004).

As vantagens destas células da linha celular MG-63 de osteosarcoma, incluem a sua relativa facilidade de cultura e fornecimento elevado de material celular para efetuar um elevado número de estudos bioquímicos e moleculares em fatores capazes de regular o metabolismo dos osteoblastos (Bilbe et al, 1996).

1.2. ISOTIOCIANATOS: COMPOSTOS COM POTENCIAL ANTITUMORAL

1.2.1. CARACTERIZAÇÃO GERAL

Dentro dos compostos com potencial interesse na utilização antitumoral, contam-se os isotiocianatos.

Uma grande parte dos vegetais crucíferos consumidos pertence ao género *Brassica*, incluindo, os brócolos, couve-de-bruxelas, repolho, couve-flor, couve, mostarda e o nabo (Fig 1). Tal como outros vegetais, estes contêm um elevado número de nutrientes e fitoquímicos com propriedades quimiopreventivas onde se inclui o ácido fólico, fibras, carotenóides e a clorofila. Contudo, os vegetais crucíferos são únicos no aspeto em que estes são bastante ricos como

fonte de glucosinolatos, compostos que contêm enxofre e são responsáveis por um aroma pungente e picante (Higdon et al, 2007).

Segundo Verhoeven et al (1996), 67% de todos os estudos relacionados com o consumo das Brassicáceas e o desenvolvimento de cancro apresentam uma associação inversa entre eles nos mais variados tecidos, como no rim, próstata, bexiga, cólon e estômago.

As Brassicáceas contêm muitos componentes bioativos, incluindo flavonóides, como a quercetina; minerais, como o selênio; e vitaminas, como a vitamina C. Destaca-se também a presença dos glucosinolatos (GLS), classe de metabólitos secundários presente em mais de 100 espécies da família das Brassicáceas (Kushad et al, 1999).



Figura 1 - Exemplo de vegetais pertencentes ao género *Brassica*.
<http://summertomato.com/tag/brassica/>

Os glucosinolatos são compostos de (R-C (=N-O-SO₃ -) -S-glucose) e que partilham uma estrutura química básica que consiste num grupo β-d-tioglucoose, um grupo oxima-sulfonado e uma cadeia lateral derivada de metionina,

triptofano, fenilalanina ou de aminoácidos de cadeia ramificada. Os glucosinolatos não são bioativos até que tenham sido hidrolisados enzimaticamente ao seu isotiocianato quimicamente relacionado (Fimognari et al, 2006).

A reação de hidrólise consiste na quebra da ligação tioglucosídica, pela enzima mirosinase, que liberta a glucose e forma uma aglicona ($R-C(-SH)=N-O-SO_3^-$) que é um composto instável. Por fim os fragmentos de aglicona eliminam o grupo sulfato, SO_4^{2-} , e formam o grupo isotiocianato $R-N=C=S$ (Fig 2) (Chu et al, 2009). Além da formação dos isotiocianatos, dá-se a formação de nitrilos, tiocianatos e a oxazilidina-2-tiona, dependendo a formação destes produtos do pH da reação e da disponibilidade dos iões (Fig 2) (Hayes et al, 2008).

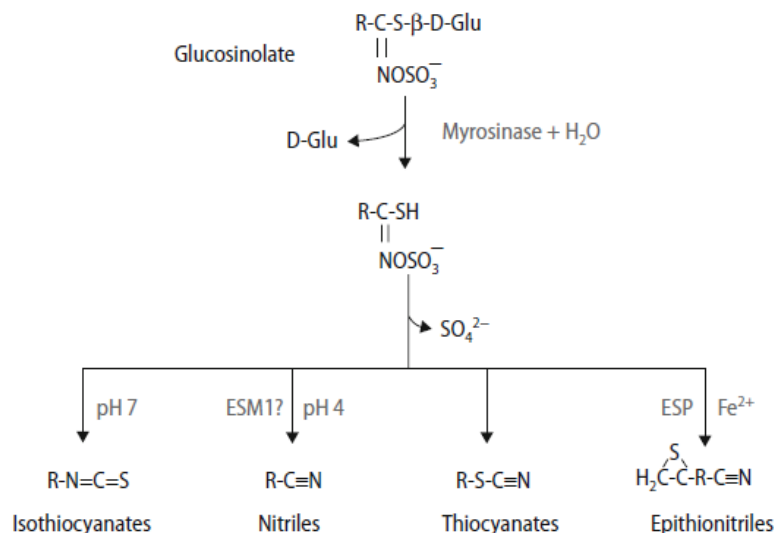


Figura 2 - Hidrólise dos glucosinolatos. Fonte: Hayes et al, 2008

Após a reação de hidrólise da enzima mirosinase, durante o processamento da comida ou durante a digestão, os isotiocianatos e os outros produtos da hidrólise dos glucosinolatos, são libertados para o lúmen intestinal. No lúmen alguns dos produtos não são absorvidos e eventualmente são digeridos pela flora intestinal, enquanto uma parte substancial dos isotiocianatos livres difunde-se passivamente para as células epiteliais mucosas (Fig 3) (Johnson, 2007)

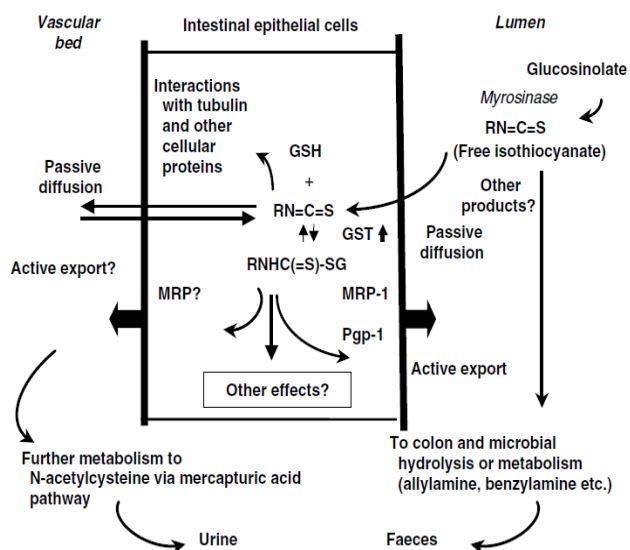


Figura 3 - Liberação de glucosinolatos no lúmen do intestino, absorção e metabolismo dos isotiocianatos e alguns locais possíveis de ação e vias de excreção. Fonte: Johnson, 2007.

Os isotiocianatos apresentam uma capacidade notável de atuar nas três fases do processo carcinogénico: iniciação tumoral, fases de progressão e promoção, e também ao intervir na supressão dos passos finais carcinogénicos isto é, angiogénese e metastização (Traka e Mithen, 2009).

O processo mecânico por trás do efeito quimiopreventivo do efeito dos isotiocianatos, parece envolver a modulação de múltiplas vias, que são reguladoras chave de doença crónica e da carcinogénese. Os seus efeitos incluem: a) proteção contra fatores externos/ambientais interferindo com o metabolismo xenobiótico, b) aumento da capacidade antioxidante das células e c) interferência com o crescimento das células tumorais (Traka e Mithen, 2009).

Outras funções conhecidas dos isotiocianatos incluem a degradação seletiva da tubulina, que é uma proteína estável, abundantemente presente no citoesqueleto e necessária para a progressão do ciclo celular (Yao et al, 2011). Estes apresentam também uma grande capacidade em induzir apoptose sendo a sua atividade pró-apoptótica primeiramente descrita nos finais dos anos 90 (Brown e Hampton, 2011). Por fim os isotiocianatos mais especificamente, o sulforafano, demonstra potencial para tratar gastrites causadas pelo *Helicobacter pylori* (Halkier e Gershenzon, 2006).

Como existem mais de 120 glucosinolatos nas diferentes variedades das Brassicáceas, os diversos tipos e concentrações de isotiocianatos resultantes da sua hidrólise, variam entre as espécies, dependendo das condições e local de plantação, altura da colheita e genótipo das espécies (Lampe et al, 2002).

Vários mecanismos são propostos para explicar o efeito quimiopreventivo dos diversos isotiocianatos presentes nas espécies que compõe a família das Brassicáceas. Pouco se sabe sobre os efeitos da maioria dos isotiocianatos presentes nos extratos das Brassicáceas, no entanto, desde que o sulforafano foi identificado pela primeira vez, em 1992, como um potente agente quimiopreventivo, os seus mecanismos têm sido amplamente estudados e revelam diferentes respostas dependendo do estágio da carcinogénese (Clarke et al, 2008).

Os isotiocianatos podem ser divididos em seis fitocompostos com base nas suas atividades biológicas, sendo esta divisão baseada naqueles presentes na nossa dieta, o isotiocianato de alilo, o isotiocianato de benzil, isotiocianato de fenetil, erucina, iberina e o sulforafano (Yao et al, 2011).

1.2.2. Sulforafano

Sulforafano é um derivado da glucorafenina [4 metil – sulfinil – butil glucosinolato] (Shan et al, 2006) e é um dos isotiocianatos mais amplamente estudado sendo encontrado de forma significativa e em grande quantidade nos vegetais do género *Brassica*, especialmente em brócolos. Muitos estudos em animais indicam que o sulforafano possui atividade quimiopreventiva contra muitos agentes carcinogénicos. (Tope e Rogers, 2009).

O sulforafano modela o processo carcinogénico através de (a) inibição da fase 1 das enzimas de fase I citocromo P450 (CYP), (b) indução das enzimas metabolizadoras de fase 2, (c) funções antioxidantes através de um aumento no níveis de GSH a nível tecidual, (d) propriedades de indução de apoptose, (e) indução de paragem do ciclo celular, (f) propriedades anti-inflamatórias e (g) inibição da angiogénese (Juge et al, 2007). Estas propriedades do sulforafano mostram que este não só é um importante agente quimiopreventivo do cancro,

capaz de inibir várias etapas do processo cancerígeno, mas também pode ser uma droga terapêutica potencialmente útil no combate ao cancro (Zhang, 2002) (Fig 4).

O metabolismo xenobiótico desempenha geralmente um papel fundamental no processo de iniciação tumoral. Convencionalmente, o metabolismo xenobiótico desenvolve-se por dois processos consecutivos, fase I e fase II (Elbarbry e Elrodi, 2011), uma vez que as enzimas de fase I convertem pró-carcinogénicos em carcinogénicos e as enzimas de fase II destoxificam os carcinogénicos e facilitam a sua excreção (Fig 5) (Clarke et al, 2008).

Assim, o sulforafano pode regular o metabolismo das enzimas de fase I pela interação direta com as enzimas citocromo P450 (CYP) ou regulando os seus níveis transcricionais na célula. A inibição dose dependente foi demonstrada com a diminuição da atividade das enzimas CYP1A1 e CYP2A2, nas células da linha tumoral da mama (Skupinska et al, 2009). Em culturas primárias de hepatócitos de ratos, o sulforafano provocou uma diminuição na atividade enzimática com CYPs 1A1 e 2B1/2, conforme o aumento da concentração (Yoxall et al, 2005). Nos hepatócitos humanos de culturas primárias, o sulforafano provocou uma diminuição nos níveis de mRNA da CYP3A4, a principal CYP no fígado humano, e por consequência levou a uma diminuição da atividade da CYP3A4 (Maheo et al, 1997).

O sulforafano é descrito como o indutor natural mais potente de enzimas de fase II tanto em animais como em humanos, onde existe uma forte relação inversa entre níveis tecidulares destas enzimas e a suscetibilidade a carcinogénicos químicos (Talalay et al, 2000). Embora muitas linhagens de células respondam ao sulforafano, existe alguma variabilidade na extensão e na indução do tipo de enzima de fase II, dependendo do tipo de linha celular (Fimognari et al, 2006). Assim em células da linha tumoral do fígado, observou-se um aumento nos níveis de mRNA para a enzima UDP-glucoronosil transferase (Maheo et al, 1997) enquanto em hepatócitos humanos de culturas primárias verificou-se um aumento dos níveis de mRNA para a enzima glutathione-S-transferase (Bacon et al, 2003). Em estudos *in vivo* com ratos verificou-se um

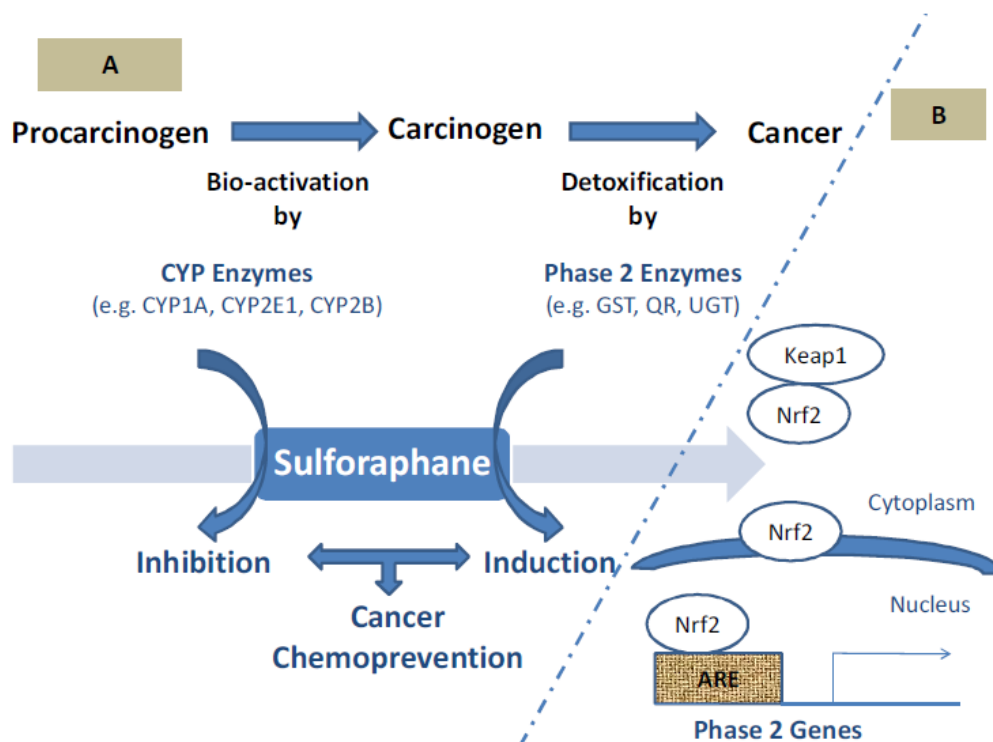


Figura 4 - Quimioprevenção do cancro pelo sulforafano através da modulação de enzimas metabolizadoras. Fonte: Elbarbry et al, 2011

aumento das enzimas quinona oxiredutase 1 e da glutathiona-S-transferase (Jones e Brooks, 2006).

Embora o sulforafano não seja um antioxidante de ação direta ou pró-oxidante, existem evidências substanciais de que o sulforafano atua indiretamente, de modo a aumentar a capacidade antioxidante das células animais e as suas habilidades para lidar com o stress oxidativo (Fahey e Talalay, 1999). Verificou-se que o sulforafano aumentou os níveis de glutathiona, que é uma molécula que mantém o equilíbrio redox e protege as células das espécies reativas de oxigénio, 4,3 vezes mais em células tumorais humanas de fígado (Ye e Zhang, 2001).

A apoptose desempenha um importante papel no desenvolvimento e manutenção da homeostasia e também na eliminação de células que estão danificadas, ou deixaram de ser necessários para o organismo. A regulação inadequada da apoptose tem sido implicada numa extensa variedade de doenças, entre elas o cancro. Por outro lado, a indução de apoptose pode representar um mecanismo de proteção pelos quais vários fitocompostos, incluindo o sulforafano,

podem inibir essas desordens celulares (Elbarbry e Elrodi, 2011). O processo apoptótico pode ser executado pela cascata de caspases, que são proteases de cisteína responsáveis pela iniciação e execução de apoptose. Assim, a indução de apoptose é um dos potenciais biomarcadores de uma dose biologicamente efetiva de moléculas quimiopreventivas (De Flora et al, 2001). Neste contexto verificou-se que o sulforafano é um indutor de apoptose em várias linhas tumorais tais como; bexiga (Shan et al, 2006), ovário (Bryant et al, 2010), cólon (Gamet-Payraastre et al, 2000), e cérebro (Karmakar et al, 2006 e Van Meir et al, 2010). Verificou-se também que o sulforafano induziu apoptose em linhas tumorais de osteosarcoma de ratinho como a LM8 (Matsui et al, 2007) e em linhas de osteosarcoma humano como a U2-OS (Kim et al, 2011). Verificou-se que estes resultados ocorriam de modo dose dependente.

A progressão do ciclo celular através das quatro fases, G_1 , S, G_2 e M, é regulada pelas moléculas quinase dependentes de ciclina (CDK) e as ciclinas, que conduzem a célula de uma fase para outra e que por sua vez, são reguladas por inibidores (Fig 6) (Juge et al, 2007). Existe um vasto leque de evidências de que o sulforafano pode parar o ciclo celular em diferentes estágios da sua progressão, um mecanismo pelo qual pode inibir a proliferação de células cancerosas e exercer o seu efeito anti-cancerígeno (Elbarbry e Elrodi, 2011). A paragem do ciclo celular por ação do sulforafano foi observada em células da linha tumoral da próstata, uma vez que este promove a paragem do ciclo celular na fase G_2 /M (Singh, et al 2004). Em células da linha tumoral Jurkat T (Fimognari et al 2002) e em células da linha tumoral da mama (Jackson e Singletary, 2004), observou-se igualmente a paragem do ciclo celular na fase G_2 /M, enquanto em células da linha tumoral do carcinoma da bexiga, observou-se uma paragem do ciclo celular na fase G_0 / G_1 (Shan et al, 2006). Evidências para a paragem do ciclo celular em linhas tumorais derivadas de osteosarcoma estão descritas para as linhas tumorais LM8 de roedores, em que ocorreu paragem do ciclo celular para a fase G_2 /M (Taka-Aki et al, 2007) e para a linha humana tumoral de osteosarcoma U2-OS, onde se verificou igualmente paragem do ciclo celular na fase G_2 /M (Kim et al, 2011).

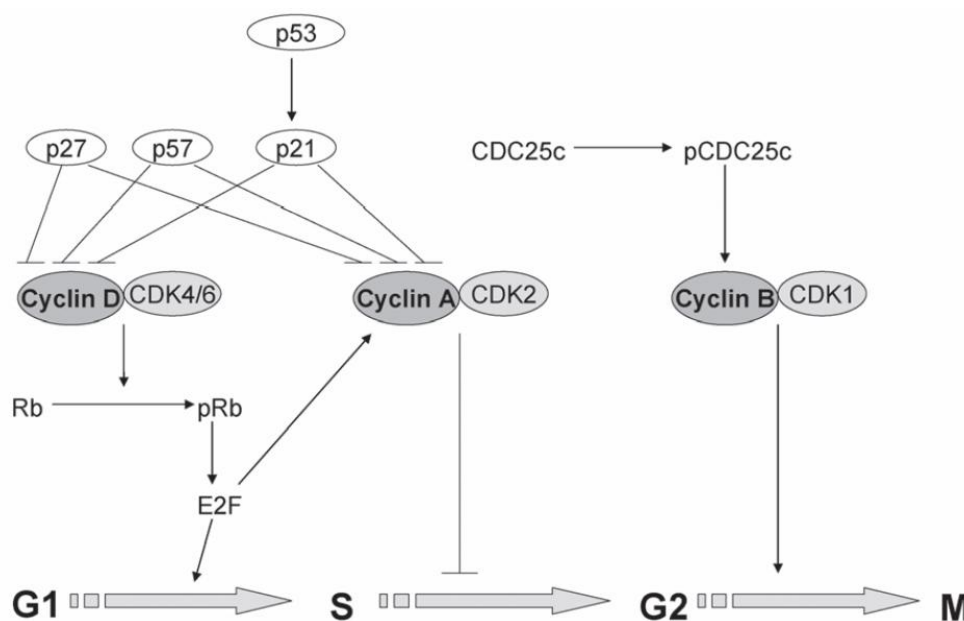


Figura 5 - Sulforafano induz a paragem do ciclo celular através da modulação de diferentes fases da progressão do ciclo celular. Fonte: Juge et al, 2007

Embora se pense desde há muito que a inflamação crónica e o processo carcinogénico estejam mecanicamente ligados, só mais recentemente é que esta associação foi aceite (Heiss et al, 2001). Recentes estudos sobre a associação entre inflamação e cancro têm identificado várias moléculas chave a mediar o processo inflamatório de formação e promoção de tumores sendo uma dessas moléculas o fator nuclear-kB (NF-kB) (Clarke et al, 2008), assim foi realizado um ensaio onde, para as linhas tumorais da próstata LNCaP P53, foram administradas concentrações de 20 e 40 μ M de sulforafano e após uma hora de tratamento já se observava em ambas as concentrações uma diminuição acentuada do nível de NF-kB (Choi et al, 2008).

A angiogénese é um processo fisiológico relevante para o crescimento de tecidos, remodelação e cicatrização de feridas, mas também é um pré-requisito para o crescimento de tumores e metástases (Carmeliet e Rakesh, 2000). Um estudo realizado notou que o sulforafano inibia a atividade proliferativa em human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) por apoptose de modo dose dependente (Asakage et al, 2006).

1.3. ENSAIOS *IN VIVO* VS. *IN VITRO*

1.3.1. Ensaios *in vivo*: breves considerações

Para além das considerações éticas que cada vez mais envolvem os ensaios *in vivo*, outras vantagens do uso de modelos de células *in vitro* assentam na aplicabilidade prática, como a facilidade de cultura, o seu relativamente baixo custo e rendimento elevado. Além disso, é relativamente fácil alterar a expressão génica para testar hipóteses específicas sobre os mecanismos de ação dos fitoquímicos. A cultura de células permite, assim, usar modelos simples e possibilita a observação de efeitos dos fitocompostos em ambientes bem definidos e controlados.

Os estudos em linhas celulares são particularmente relevantes para os estudos iniciais na compreensão dos mecanismos de prevenção encontrados nos produtos das plantas. Em complemento aos ensaios *in vitro*, os ensaios *in vivo* apresentam também inúmeras vantagens, nomeadamente a complexidade de se trabalhar com órgãos e sistemas, atualmente impossível ou difícil de reproduzir *in vitro*. O uso de modelos animais é amplamente utilizado para explorar a atividade biológica dos fitoquímicos presentes na dieta, com a expectativa de que os efeitos observados nestes modelos possam ser extrapolados para os humanos. Os modelos animais mais frequentes usados são os ratinhos. Estes modelos animais são largamente usados para modelar respostas em estudos nutricionais, considerando o elevado grau de ortologia entre ratinhos e os seres humanos, uma vez que a proporção de genes do rato com uma única identificação ortóloga no genoma humano é de aproximadamente 80%. Esta característica torna estes roedores um excelente modelo para investigar alterações ambientais e genéticas raramente exequíveis em humanos.

O pequeno tamanho, o tempo de gestação e a esperança de vida destes roedores, faz com seja possível uma criação rápida de um grande número de animais e, conseqüentemente os ensaios pré-clínicos em modelos animais possam ser realizados num relativo curto espaço de tempo, permitindo o estudo de resposta crónica à doença após manipulação nutricional e fornecendo dados farmacológicos, toxicológicos e biológicos de valor inestimável que podem prever a eficácia clínica de componentes presentes na dieta. Além disso, é possível

realizar uma análise abrangente da resposta à doença através da proteómica, transcriptómica, e análises da metabolómica. A principal limitação destes modelos é que, apesar do facto dos animais seleccionados nos estudos preventivos apresentarem características semelhantes às da doença sob investigação, estes nunca apresentam características morfológicas, fisiológicas, ou bioquímicas idênticas (Traka e Mithen, 2011).

1.3.2. Ensaio de compostos *in vitro*

Os ensaios de novos compostos, como os de atividade antitumoral, passam por estudos de citotoxicidade ou de genotoxicidade em células tumorais e/ou normais *in vitro*. Destacam-se abaixo alguns aspetos relacionados com a citotoxicidade e a genotoxicidade *in vitro*.

O termo citotoxicidade refere-se aos efeitos adversos que ocorrem a partir da interação de um agente tóxico com as estruturas e / ou processos essenciais para a sobrevivência, proliferação e / ou função celular (Bakand et al, 2005). Atualmente é difícil monitorizar os efeitos sistémicos fisiológicos *in vitro*, assim, a maioria dos ensaios determina os efeitos a nível celular (Freshney, 2010). O desenvolvimento de ensaios de citotoxicidade *in vitro* tem sido impulsionado pela necessidade de avaliar rapidamente a potencial toxicidade de um grande número de compostos, para assim limitar sempre que possível a experimentação animal e realizar testes com pequenas quantidades de composto. Os ensaios de citotoxicidade avaliam as alterações induzidas por drogas em vias metabólicas ou de integridade estrutural, que podem ou não estar diretamente relacionadas com a morte celular (Masters, 2000).

A mutagenicidade refere-se à indução de alterações permanentes e transmissíveis na quantidade ou na estrutura do material genético das células ou organismos. Estas alterações podem envolver um único gene (mutações pontuais), um bloco de genes ou cromossomas inteiros (aberrações cromossómicas estruturais ou numéricas). A genotoxicidade é um termo mais amplo e refere-se a processos que alteram a estrutura, o conteúdo da informação

e a segregação do DNA e que não são necessariamente associados a mutagenicidade. Tais processos incluem síntese do ADN, troca de cromátides irmãs, quebras de cadeia de DNA, formação de aductos de DNA e recombinação mitótica (Serafimova, et al 2010).

1.3.3. Citometria de fluxo (FCM)

A citometria de fluxo foi primeiramente desenvolvida, para a contagem e análise de células sanguíneas, no final dos anos 50. A hematologia e a imunologia celular foram sem dúvida as duas áreas da Biologia que estimularam o desenvolvimento da tecnologia da citometria de fluxo. No entanto, com a natural evolução dos meios técnicos e com o aparecimento de novos marcadores fluorescentes, a utilização desta instrumentação alastrou-se a outras áreas e a estudos com outros tipos de células, como por exemplo células vegetais e microbianas (Loureiro e Santos, 2004).

Um citómetro de fluxo (Fig 7) é um sistema constituído por 5 elementos: uma fonte de luz, (lâmpada de mercúrio ou laser), uma câmara de fluxo, unidades de filtros ópticos para selecção de um intervalo de comprimento de onda específico, a partir duma gama espectral mais vasta, fotodíodos ou fotomultiplicadores para a detecção sensível e processamento dos sinais com relevância e uma unidade que processa os dados recolhidos (Silva et al, 2004).

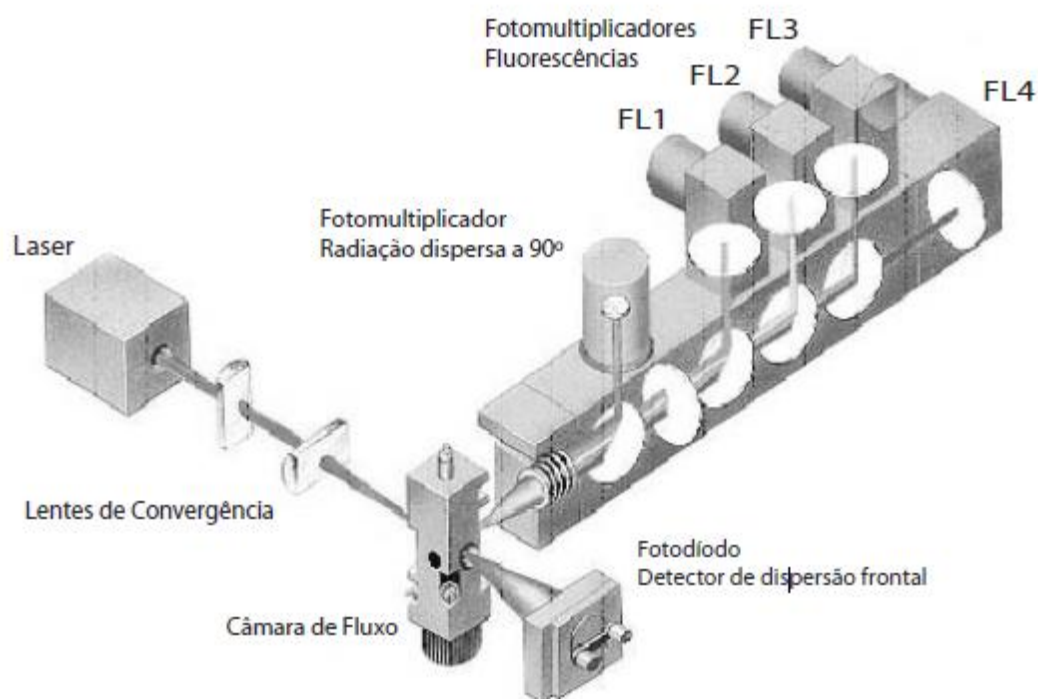


Figura 6 - Representação esquemática de um citômetro de fluxo (retirado de Silva et al, 2004)

A suspensão celular é injetada e atravessa a câmara (Fig 8) onde se dá uma passagem, célula a célula através do feixe de luz, perpendicular ao fluxo. A passagem individual das células é conseguida através da focagem hidrodinâmica do fluxo da amostra, sendo esta injectada no seio de uma solução salina (*sheath fluid*) que também atravessa a câmara. A diferença de velocidades entre os dois fluidos faz com que o fluxo se processe em regime laminar. A velocidade de escoamento da solução de revestimento (*sheath fluid*) é superior à da amostra e é ajustável, o que irá permitir reduzir e controlar a espessura da solução da amostra para que possa passar uma célula de cada vez. Desta forma, podem-se detetar até 10000 células (eventos) por segundo. O feixe de luz de excitação ao interceptar a célula na câmara, sofre dispersão tanto na direção frontal (*forward scattering - FS*), quer lateral (*side scattering- SS*). A luz assim dispersa vai ser detetada diretamente por fotodíodos (dispersão frontal) ou a 90° (dispersão ortogonal) por tubos fotomultiplicadores. A combinação dos dois tipos de luz dispersa vai apresentar informações relevantes, designadamente, a dimensão celular, a granularidade/complexidade e a morfologia (Silva et al, 2004).

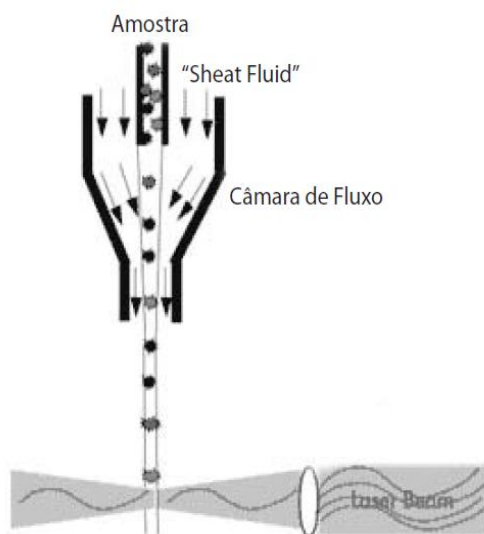


Figura 7 – Representação esquemática de uma câmara de fluxo.
http://madtechs.blogspot.com/2008_06_29_archiar.html in Silva et al, 2004)

Compostos intracelulares com fluorescência própria (ex: clorofilas, ficobiliproteínas, NAD(P)H, etc.) ou suscetíveis de se ligarem a corantes fluorescentes (fluorocromos), possibilitam a diferenciação seletiva de subpopulações com base na combinação de vários fluorocromos. A fluorescência destes compostos é também detectada por fotomultiplicadores, através de um sistema de lentes, espelhos dicróicos e filtros ópticos (Silva et al, 2004).

Os citômetros atuais mais sofisticados podem possuir até 16 (ou mais recentemente até 20) detectores em simultâneo (luz dispersa e fluorescente), o que lhes permite analisar múltiplas possibilidades de características celulares e/ou componentes celulares de um grande número de células de forma individual. Esta característica versátil denomina-se por análise multiparamétrica, (Silva et al, 2004; Bernas et al, 2006).

1.3.4. Técnicas de avaliação de cito e /ou genotoxicidade

A citotoxicidade pode ser avaliada por uma enorme bateria de técnicas. Os ensaios de citotoxicidade são amplamente utilizados em estudos de toxicologia *in vitro*, sendo os mais comuns a, libertação da enzima lactato

desidrogenase (LDH), o vermelho neutro (3-amino-m-dimetilamino-2-metilfenazina) clorohidrato, o azul de tripano e o ensaio de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2il) - 2,5-difenil de tetrazólio), utilizados para a detecção de citotoxicidade ou viabilidade celular após exposição a substâncias tóxicas (Fotakis e Timbrell, 2006). Estes ensaios foram otimizados para o uso de microplacas (formato de 96 poços). Essa miniaturização permite a análise de muitas amostras rapidamente e em simultâneo (Weyermann et al, 2005).

O ensaio da libertação da enzima lactato desidrogenase (LDH) é baseado na medição da atividade da LDH no meio extracelular (Fotakis e Timbrell, 2006). Esta é uma enzima citoplasmática estável presente em todas as células, que é libertada para o meio de cultura devido à perda da integridade da membrana e que pode ser quantificada por espectrofotometria, permitindo avaliar o número de células vivas (Chiellini, 2006). Esta técnica é conhecida pela sua fiabilidade, velocidade e facilidade de execução (Fotakis e Timbrell, 2006).

O vermelho neutro tem sido utilizado para a identificação de células vivas em culturas. Este ensaio quantifica o número de células viáveis e intactas após a sua exposição a tóxicos e baseia-se na absorção e subsequente acumulação lisossomal do corante supravital, vermelho neutro. (Weyermann et al, 2004).

O ensaio MTT, (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2il) - 2,5-difenil de tetrazólio) baseia-se na capacidade das desidrogenases associadas ao NADPH e ao NADH, em células vivas, converterem o substrato amarelo solúvel em água (MTT) num produto de cor púrpura, no interior das células, os cristais de formazano. Estes cristais podem ser observados ao microscópio e extraídos com solventes orgânicos, como por exemplo o DMSO (Dimetilsulfóxido), permitindo a sua quantificação por espectrofotometria. Quanto maior intensidade de púrpura se observar, maior o número de células viáveis (Mossman, 1983). A posterior alteração do protocolo inicial descrito por Mossman em 1983 foi proposta, a fim de melhorar a reprodutibilidade e a sensibilidade do ensaio (Fotakis et al, 2006).

O azul de tripano é um corante que tem sido amplamente utilizado para corar seletivamente tecidos ou células mortas. O mecanismo da coloração do azul de tripano é baseado no fato deste ser carregado negativamente e não interagir com as células a menos que a membrana esteja danificada. Uma vez que, as

células sem danos são muito seletivas sobre os compostos que passam através das suas membranas, estas não devem corar com o azul de tripano. Portanto, todas as células que excluem o corante são consideradas viáveis (Tran et al, 2011).

O Ensaio Cometa ou eletroforese em gel de células individualizadas é um dos muitos ensaios utilizado para detetar microscopicamente danos no DNA ao nível de uma única célula (Kumaravel et al, 2009). Este combina a simplicidade de técnicas bioquímicas para detecção de quebra de DNA de cadeia simples (quebras de cadeia e excisão incompleta dos locais de reparação), sítios alcalinos lábeis e locais de “cross-linking”, com a abordagem celular individualizada típica de ensaios citogenéticos (Jha, 2008). A determinação de danos é realizada quer através de observação visual de células (após a classificação em diferentes categorias, com base no comprimento da cauda e forma) ou usando diferentes tipos de software de domínio público comercialmente disponíveis (que reconhecem automaticamente a extensão do dano). Neste ensaio, o tamanho, forma e quantidade de DNA dentro do 'cometa' desempenham papéis importantes na determinação do nível de danos. O uso de um “software”, também fornece uma série de parâmetros diferentes, muitas das quais podem não ser relevantes para a determinação da extensão dos danos no DNA (Kumaravel et al, 2009).

O dano de DNA e a reparação defeituosa do DNA são os eventos moleculares subjacentes que dirigem a iniciação e progressão do cancro. Portanto, não é surpreendente que muitos estudos tenham utilizado o ensaio cometa para investigar danos no DNA e características de reparação, numa ampla gama de células tumorais em resposta a uma variedade de agentes que danificam DNA. Estes estudos incluem investigações sobre linhas de células humanas tumorais como investigações em células tumorais extraídas de pacientes com cancro (McKenna et al 2008).

Entre as principais vantagens do Ensaio Cometa incluem-se: (a) a recolha de dados por análise de célula a célula, permitindo análises estatísticas mais consistentes, (b) a necessidade de apenas recolha de amostras com um pequeno número de células (<10000 por amostra inicial), (c) sensibilidade para detetar

danos no DNA e (d) uso de qualquer população eucariota de células individualizadas tanto *in vitro* como *in vivo* (Costa et al, 2011).

Apesar de grandes vantagens, algumas desvantagens também estão associadas ao ensaio cometa. Teoricamente, o teste do cometa pode ser usado para todas as células animais, contudo, algumas vezes não são alcançados dados consistentes. Alguns estudos têm sido publicados sobre o ensaio cometa *in vivo*; no entanto, atualmente não existem disponíveis controles apropriados para o ensaio cometa *in vivo*. O ensaio cometa não é capaz de detectar pequenos fragmentos de DNA (menores de 50 kb), uma vez que são na sua maioria lavados durante a lise e a eletroforese. O ensaio também falha para detectar danos associados ao DNA mitocondrial, uma vez que também são muito pequenos. Células apoptóticas também são lavados durante a lise e eletroforese, não sendo portanto detectadas através de ensaio cometa (Nossoni, 2008).

A análise do ciclo celular e da cinética da proliferação celular são dois parâmetros importantes na avaliação da progressão de tumores e em estudos toxicológicos. Devido à sua importância, têm-se investido bastantes esforços para desenvolver técnicas que sejam cada vez mais precisas, rápidas e fáceis de realizar. O aparecimento da citometria de fluxo levou à possibilidade de executar estas medições com uma precisão e rapidez inigualáveis levando a enormes progressos na área da biologia celular, especialmente no campo do ciclo celular.

O ciclo celular é o fenómeno biológico que permite a todas as células indiferenciadas originar células filhas com as mesmas características genéticas e que, aquando da saída do ciclo celular, se diferenciem (Azevedo, 2005).

O ciclo celular divide-se tradicionalmente em interfase e mitose. A fase de divisão, denominada mitose ou fase M, é separada da divisão seguinte pela interfase. A observação de que a duplicação (replicação) dos cromossomas ocorre durante um período específico da interfase originou a sua divisão em três partes, tendo o período de síntese do DNA sido denominado fase S, a fase que o antecede G_1 e o período entre a fase S e a mitose seguinte, G_2 (Fig 9) (Alberts et al, 2002).

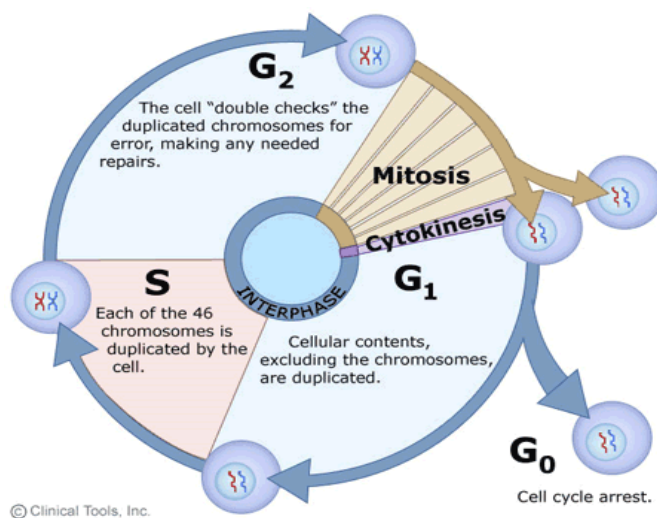


Figura 8 - Esquema representativo do ciclo celular de eucariontes (reirado de <http://www2.le.ac.uk/departments/genetics/cellcycle-mitosis-meiosis>)

A fase G1 é a primeira fase do ciclo celular, em que há o crescimento celular e a síntese de proteínas e de RNA. É o período que decorre entre o final da mitose e o início da síntese de DNA. Ela dura normalmente entre 6 e 12 horas, período em que célula duplica o seu tamanho e massa, devido à síntese contínua de todos os componentes, como resultado da expressão de genes que codificam proteínas responsáveis pelo seu fenótipo particular (Alberts et al, 2002).

A Fase S é a segunda fase do ciclo celular, caracterizada por ocorrer a síntese ou replicação de DNA, como resultado, cada cromossoma é duplicado e é composto por dois cromátídeos idênticos. Na replicação do DNA, o núcleo contém o dobro de proteínas e de DNA nuclear, comparado com o início do ciclo. Ela dura em geral, cerca de 6-8 horas (Alberts et al, 2002).

A fase G2 é a terceira fase de crescimento do ciclo celular caracterizada pela continuação da síntese de proteínas e RNA. No final deste período é observado sob o microscópio de alterações na estrutura celular, o que indica o início da divisão celular. Ela pode ter uma duração média de 3 a 4 horas. Termina quando a cromatina começa a condensar no início da mitose (Alberts et al, 2002).

A fase M corresponde à mitose, período no qual os cromossomas replicados são divididos em dois núcleos separados e onde ocorre a divisão citoplasmática (citocinese), originando duas células filhas.

Para além destas quatro fases, existe a fase G₀, que é frequentemente agrupada à fase G₁ (mas associada a processos de, e.g., diferenciação, e não de divisão) e pode ser muito prolongada. Esta fase observa-se em células caracterizadas por um longo período de vida e que raramente se dividem (células quiescentes). No entanto, após estímulos adequados, as células podem deixar este estado, entrar em G₁ e dar assim seguimento ao ciclo celular (Azevedo 2005).

No modelo de ciclo celular exposto por Howard e Pelc (1986), o tempo entre cada mitose encontra-se dividido em três fases: G₁, S e G₂. Durante o período de crescimento celular (fase G₁) uma célula diplóide exibe um conteúdo 2C (C – conteúdo de um conjunto haplóide de cromossomas) em ADN nuclear, ou seja., possui duas cópias de cada gene. Durante a fase S ocorre a duplicação do genoma nuclear e na fase seguinte (fase G₂) vai ocorrer o segundo período de crescimento celular, durante o qual o conteúdo em ADN nuclear é conservado no nível 4C. Ocorrendo de seguida a mitose (fase M) durante a qual a célula se divide, formando-se duas células filhas, contendo, cada uma, um conteúdo 2C em ADN (Loureiro e Santos 2004).

Dado que o objetivo é quantificar de forma absoluta ou relativa o DNA total do núcleo, o passo inicial deste tipo de análises por citometria de fluxo, consiste no isolamento de núcleos intactos, o que é geralmente conseguido com a utilização de um tampão lise e de um método de isolamento adequado ao tipo de material a analisar (ex: tecido animal, células em suspensão, material parafinado) (Shapiro, 2005).

1.4. OBJETIVOS DESTA DISSERTAÇÃO

Esta dissertação teve como objetivo principal, avaliar aspetos de cito e genotoxicidade do sulforafano em células de osteosarcoma humano.

Para esse efeito, usaram-se células da linha tumoral humana de osteosarcoma MG-63 *in vitro*. Estas células foram expostas ao composto sulforafano e a citotoxicidade deste, foi avaliada durante 24 e 48 horas,

recorrendo a um ensaio de referência (ensaio MTT) para determinar a viabilidade celular. Em complementaridade com estudos de citometria de fluxo avaliou-se ciclo celular e putativas alterações na ploidia. Por outro lado, o ensaio cometa permitiu a avaliação de danos genotóxicos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. MANUTENÇÃO DA CULTURA DE CÉLULAS

As células MG-63 são cultivadas em frascos de 75 cm² (Corning), com o meio α -Minimal Essential Medium (α -MEM) (Gibco Invitrogen) suplementado com 10% FBS (Gibco Invitrogen) 2,5 μ g/ml de fungizona (Gibco Invitrogen) 10000 unidades/mL de penicilina/estreptomicina (Gibco Invitrogen) a 37 °C numa atmosfera húmida contendo 5 % de CO₂.

As células são observadas diariamente ao microscópio invertido (ampliação 40x) (Leica) para verificar o seu estado de confluência, morfologia e eventuais contaminações por fungos ou bactérias. As células foram subcultivadas de 3 em 3 dias, período após o qual atingiram uma confluência de 80 a 90 % (confluência é a % de ocupação da superfície do frasco disponível para o crescimento celular).

Uma vez que as células MG-63 crescem em monocamada aderente, a passagem (subcultura) das mesmas envolve a adição de uma enzima proteolítica, a tripsina que digere as adesões célula-célula e também dissocia as células do frasco de cultura. Para tal, o meio de cultura foi retirado e as células foram lavadas com 5 ml de tampão fosfato salino, (PBS) (Gibco, Invitrogen), a pH 7,2. Após a lavagem das células, adicionaram-se 3 ml de uma solução de tripsina – ácido etilenodiamina tetracético (EDTA) (0,25% tripsina, 1mM EDTA) (Gibco) e incubou-se o frasco durante 5 minutos a 37°C. Para inativar a tripsina adicionaram-se 6 ml de meio de cultura completo. As células foram ressuspensas para separar eventuais aglomerados e assegurar que todas as células fossem removidas do frasco. Posteriormente, retirou-se 10 μ L da suspensão para realizar a contagem das células usando uma câmara de contagem (Neubauer) e determinou-se a densidade celular da suspensão. Num novo frasco, adicionou-se o volume adequado da suspensão em meio α -MEM completo, de modo a obter uma densidade de 1×10^6 células/ml.

2.2. CRIOPRESERVAÇÃO DAS CÉLULAS

Após a tripsinização e contagem das células no hemocitómetro, determinou-se o volume de suspensão celular necessário a obter a densidade celular de $1,5 \times 10^6$ /ml, transferindo a solução para um tubo de 15 ml. A suspensão foi centrifugada, a 1000 r.p.m durante 5 minutos. O sobrenadante foi retirado, e ressuspenderam-se as células em 1 ml de meio de cultura com 10% de DMSO estéril. A suspensão, devidamente identificada, foi transferida para uma ampola de criopreservação e esta foi colocada no contentor de congelação “Mr. Frosty” (Nalgene) a 4°C durante 1 hora. No final deste tempo, o “Mr. Frosty” foi colocado a -80°C, tendo conservado esta temperatura durante a noite. No dia seguinte as ampolas foram transportadas em azoto líquido ou gelo seco até ao contentor de azoto.

2.3. EXPOSIÇÃO A SULFORAFANO

O sulforafano (Sigma Aldrich) foi diluído em dimetil sulfóxido (DMSO) numa concentração final de 10 mM e armazenado a -20 °C. A partir desta solução stock foram preparadas duas soluções de sulforafano a 5 e 10 µM por diluição com meio de cultura. As células foram incubadas durante 24 horas a 37 °C numa atmosfera humidificada a 5% de CO₂ para adesão. Após as 24 horas procedeu-se à remoção do meio de cultura e sua substituição por meio de cultura com sulforafano nas concentrações 5 e 10 µM.

2.4. ENSAIO MTT

O ensaio do MTT, foi realizado de acordo com Lévesque et al, 2008, em placas de 96 poços. Em cada poço foram colocados 100 µl de suspensão de células na concentração de 1×10^4 /ml. Após as 24 horas necessárias para adesão celular procedeu-se à remoção do meio de cultura e à sua substituição com 100 µl de meio de cultura com sulforafano nas concentrações 5 e 10 µM. No controlo procedeu-se à substituição por meio novo. Foram realizadas quatro réplicas tanto no controlo como nas concentrações de sulforafano. De seguida incubaram-se as

placas durante 48 h nas condições normais de cultura. As células foram observadas diariamente, num microscópio com ampliação de 40 x, de modo a verificar a sua morfologia e confluência. No final de cada período de incubação, as placas voltaram a ser observadas para verificar a sua confluência, sendo depois adicionado a solução MTT (1mg mL^{-1} em PBS pH 7,2) em cada poço. As placas foram mantidas durante 4 horas na incubadora (Binder) a 37°C e 5 % de CO_2 . Depois das 4 horas de incubação, retirou-se a solução de MTT e adicionaram-se 150 μl de DMSO (Sigma). Logo de seguida colocou-se a placa num agitador orbital e deixou-se incubar durante 2 horas à temperatura ambiente e protegida da luz. Por último, fez-se a medição das absorvância num leitor de microplacas a 570 nm, que foram corrigidas a A570 média do branco. A percentagem da inibição do crescimento celular foi calculada usando a fórmula: % de viabilidade relativa = $A570 \text{ Amostra} / A570 \text{ controlo} \times 100$.

2.5. CICLO CELULAR

Neste ensaio, as células depois de tripsinizadas, foram ressuspensas em meio α -MEM completo, com uma densidade de 2×10^5 células por mL^{-1} e plaqueadas em placas de 6 poços (1ml/poço). As placas foram incubadas durante 24 horas nas condições de cultura descritas. Após este período, removeu-se o meio de cultura e este foi substituído pelo mesmo volume da solução celular com as concentrações de sulforafano. Para cada condição fizeram-se 4 réplicas. As placas foram a incubar a 37°C , 5% de CO_2 em condições de humidade, durante 24 e 48 horas. No final do tempo de incubação, as células foram observadas num microscópio invertido (ampliação 40x). De seguida, lavaram-se as células com 1 ml de PBS pH 7,2 (Gibco) e estas foram tratadas com 300 μL de tripsina/EDTA (Gibco). Depois deste passo inativou-se a tripsina com 600 μL do meio de cultura e procedeu-se à transferência da suspensão celular para um tubo de 2 mL. A suspensão celular foi centrifugada a 2000 r.p.m durante 5 minutos e o sedimento foi ressuspendido em 1 mL de PBS. Voltaram-se a centrifugar células a 2000 r.p.m durante 5 minutos e por fim ressuspenderam-se em 1 ml de etanol a 85% frio e mantiveram-se a -20°C até se proceder à sua análise. No momento da

análise da amostra, as células foram centrifugadas a 2000 r.p.m durante 5 minutos, ressuspendidas em 800 µL de PBS e vortexadas durante 15 a 20 segundos. Adicionaram-se 50 µL do fluorocromo iodeto de propídio (IP) para corar o DNA nuclear e juntou-se 50 µL de RNase (Sigma) para eliminar o RNA da amostra. Seguidamente deixaram-se as amostras a incubar durante 20 minutos à temperatura ambiente e protegidas da luz até serem analisadas no citómetro de fluxo. A intensidade da fluorescência relativa (FL) dos núcleos marcados com IP foi medida num citómetro de fluxo Beckman Coulter Epics-XL (Beckman Coulter). Como fonte de excitação foi usado um laser de Árgon de 15 mW e a emitir a 488 nm. Os resultados foram adquiridos usando o programa SYSTEM II versão 3.0 (Beckman Coulter). Em cada réplica, sempre que possível, foram analisados pelo menos 5500 núcleos. Os núcleos agregados (dupletos), núcleos parciais, núcleos associados ao citoplasma e outro lixo presente nas amostras, foram eliminados da análise definindo uma região específica no citograma de área vs altura do pico da FL. A análise do ciclo celular foi realizada com base em histogramas.

2.6. ENSAIO COMETA

O ensaio cometa ou Eletroforese Gel Único Cell (SCGE) foi realizada conforme descrito por (Singh et al 1988; Tice et al 2000) com ligeiras modificações.

A preparação das soluções e das lâminas foi realizada antes do início do ensaio: Lâminas com extremidades foscas foram mergulhados numa solução de 1% do agarose de ponto de fusão normal (NMPA) e secas durante a noite a temperatura ambiente. Neste ensaio, as células foram plaqueadas em placas de 6 poços numa densidade de 2×10^5 células por poço, sendo incubadas durante 24 horas numa atmosfera humidificada a 37°C, 5% de CO₂. Depois do tempo de incubação, o meio de cultura foi substituído pelo mesmo volume de meio com sulforafano a 5 e 10 µM, No controlo o meio foi substituído por meio fresco. As células foram incubadas durante 24 e 48 horas nas condições de cultura descritas acima. Após este tempo as células foram lavadas com 300 µL de PBS pH 7,2 (Gibco), tratadas com 300 µL de tripsina/EDTA (Gibco), que foi posteriormente

inativada com 600 µL de meio de cultura, sendo as células por fim recolhidas. Estas foram a centrifugar durante 5 minutos a 2000 r.p.m, retirou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se em 50 µL de PBS. O controlo positivo foi ressuspendido em 100 mM H₂O₂ durante 10 minutos e posteriormente centrifugado durante 5 minutos e ressuspendido em PBS. Uma mistura de 50 µL da suspensão de células e 50 µL de 1% agarose baixo ponto de fusão (LMPA), previamente aquecida a 37 ° C foi espalhada em cada lâmina com a camada seca de NPMA e sendo cada lâmina coberta com uma lamela. Deixou-se arrefecer as lâminas, no frigorífico a 4°C, durante pelo menos 5 minutos de modo a estas solidificarem, após este período retirou-se a lamela. As lâminas foram submersas na solução de lise previamente arrefecida a 4°C (150 ml de solução de lise composta de duas soluções: uma contendo 2,5 M NaCl, 100 mM EDTA; 10mM Trizma Base; 0,2 M NaOH; pH 10; e outra contendo 1% Triton X-100 e 10%DMSO), durante 2 horas. Após a lise celular, as lâminas foram retiradas da solução de lise e colocadas na horizontal na tina de eletroforese previamente preenchida com tampão de eletroforese (300mM NaOH, 1mM EDTA, pH 13). As lâminas foram expostas ao tampão durante 20 minutos para permitir a desnaturação do DNA, e o seu desenrolamento. Após este tempo iniciou-se a eletroforese, ligada a uma corrente de 300 miliamperes 0,74 V/cm durante 30 minutos no mesmo tampão. No final deste período, desligou-se a corrente, retiraram-se as lâminas do tampão e colocaram-se no tampão de neutralização (0.4 M Tampão Tris a pH 7.5) durante 5 minutos. Este passo repetiu-se duas vezes. Por fim as lâminas foram lavadas com água destilada. As lâminas foram secas e mantidas à temperatura ambiente e protegidas da luz até observação. No momento em que as lâminas foram a observar foram rehidratadas durante 15 minutos sendo depois coradas com brometo de etídio (10 mg/ml), durante 5 minutos no escuro e por fim lavadas em água destilada durante 5 minutos, para retirar o excesso. No final de observação, as lâminas foram mergulhadas em etanol absoluto para remover manchas, desidratar e ser armazenado novamente. Para amostra, foram preparadas duas lâminas e cerca de 50 a 100 células selecionadas aleatoriamente para visualização. As imagens foram fotografadas com um software de imagem (NIS Elements-F 3.00, SP7). Todas as fotografias

dos núcleos foram analisados na versão 1.2.2 do CASPLab - Comet Assay Software Project de modo a marcar automaticamente um amplo conjunto de parâmetros, tais como % de DNA na cauda, comprimento da cauda e momento da cauda, para fornecer uma descrição global do cometa.

2.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para todas as experiências foram realizados dois ensaios independentes e para cada ensaio foram feitas pelo menos três réplicas.

A análise estatística dos dados foi efetuada usando o programa SigmaPlot versão 11.0. A avaliação da existência de diferenças significativas entre o controlo e as concentrações de sulforafano foram realizadas por dois tipos de análise de variância (two way ANOVA), seguido por um teste de Holm-Sidak ($p < 0,001$) para avaliar a significância das diferenças nos parâmetros. Quando necessário, os dados foram transformados para alcançar a normalidade e igualdade de variâncias. Relativamente ao ensaio cometa a análise de dados foi realizada através de uma análise de variância (ANOVA), usando o teste paramétrico Tukey para a análise entre grupos. Considerou-se que os resultados eram estatisticamente significativos sempre que $p < 0,001$.

Todos os dados são expressos como a média \pm desvio padrão (S.D) da média.

3. Resultados

3.1. AVALIAÇÃO CITOTÓXICA DO SULFORAFANO EM CÉLULAS MG-63

3.1.1. Efeito do Sulforafano na proliferação celular e confluência das culturas

Da análise das culturas ao microscópio invertido, observou-se que quanto maior a concentração de sulforafano, menor a confluência das células nos poços de cultura e maior a alteração morfológica celular, tal como pode ser observado nas figuras 10, 11 e 12.

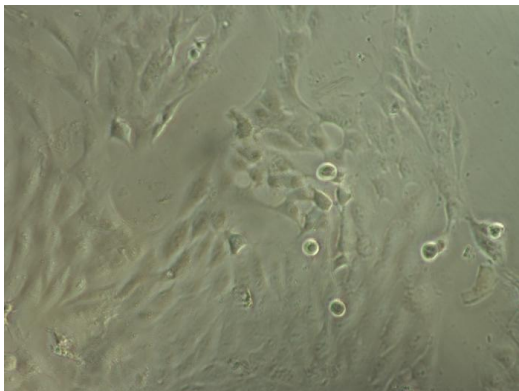


Figura 9 - Morfologia das células MG-63 controlo (0 μ M de sulforafano). Observação em microscópio invertido (ampliação 100x)

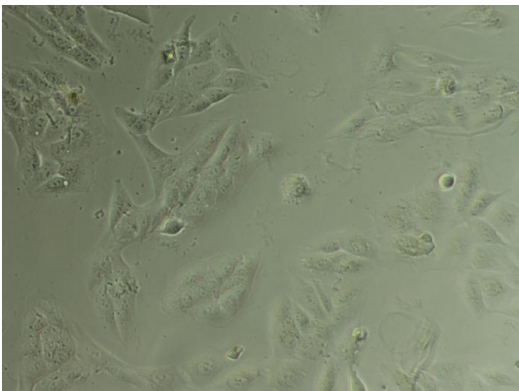


Figura 10 - Morfologia das células MG-63 expostas ao sulforafano a 5 μ M (ampliação 100x)

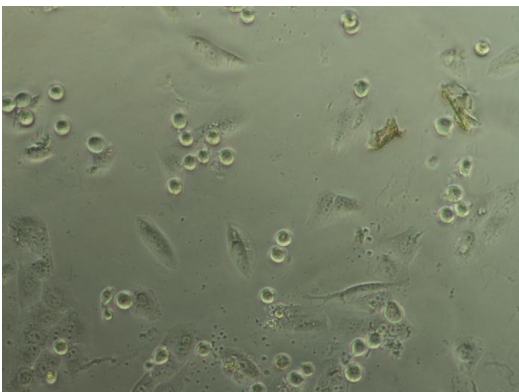


Figura 11 - Morfologia das células MG-63 expostas ao sulforafano a 10 μ M (ampliação 100x)

3.1.2. Efeito do Sulforafano na viabilidade celular (Ensaio MTT)

Como foi descrito no material e métodos, o efeito do composto sulforafano no crescimento das células MG-63 foi avaliado usando o ensaio MTT.

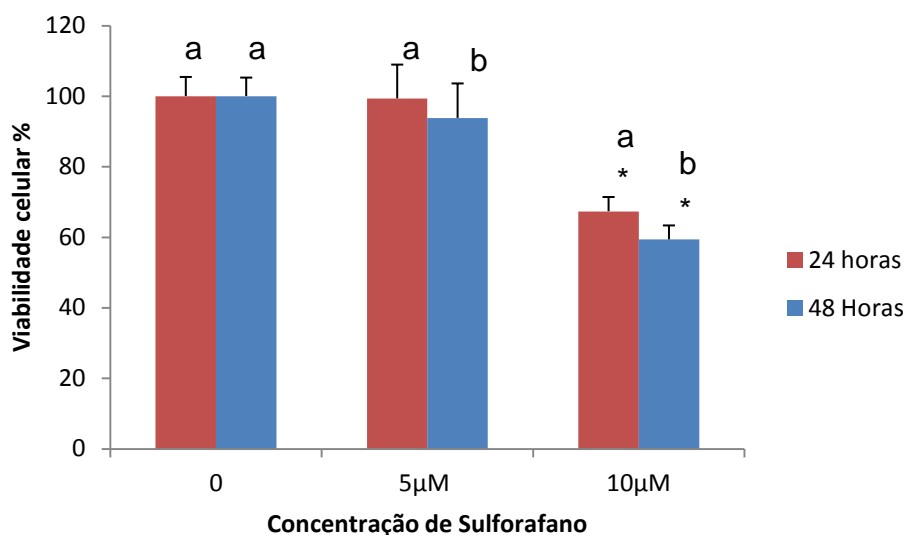


Figura 12 - Efeito do sulforafano na viabilidade das células MG-63 após 24 e 48 horas de exposição. Os valores representam a média \pm S.D. O símbolo * indica diferenças significativas entre o controlo e as restantes amostras ($p < 0,001$). Letras diferentes, a e b significam diferenças estatísticas significativas entre tempos ($p < 0,001$).

Após as 24 e 48 horas de exposição, o sulforafano provocou um decréscimo na viabilidade celular desta linha de osteosarcoma (Fig 13). Este decréscimo ocorreu de forma mais acentuada com o aumento da concentração do composto sulforafano, apresentando diferenças estatísticas, em relação ao controlo negativo para uma concentração de 10 μ M, tanto para 24 horas como para as 48 horas. Verificaram-se também diferenças estatísticas significativas entre os tempos analisados para as concentrações de 5 e 10 μ M o que indica quanto maior o tempo de exposição maior o efeito do sulforafano na viabilidade celular. A diminuição da viabilidade celular traduziu-se numa pequena inibição de crescimento de cerca de $0,66\% \pm 9,78$ e $6,2\% \pm 9,58$ respetivamente para a concentração de 5 μ M em 24 e 48 horas, comparativamente ao controlo. Enquanto a inibição de crescimento para a concentração de 10 μ M foi de $32,66\% \pm 3,94$ e $40,63\% \pm 4,03$, para 24 e 48 horas respetivamente, ou seja quase metade em relação ao controlo (Fig 13).

3.1.3. Efeito do sulforafano no ciclo celular (Citometria de fluxo)

Na figura 14, estão representados alguns exemplos de histogramas obtidos por análise de citometria de fluxo do ciclo celular das células MG-63. Os histogramas apresentam um perfil bem definido, evidente nas células controlo, com um pico principal estreito e bem definido e que apresentava um valor de CV (coeficiente de variação) médio de 3,5%. Este pico corresponde aos núcleos na fase G_0/G_1 com um conteúdo 2C em DNA. É ainda visível um segundo pico com o dobro da intensidade de fluorescência, correspondente aos núcleos que se encontram na fase G_2 do ciclo celular e que possuem um conteúdo 4C em DNA.

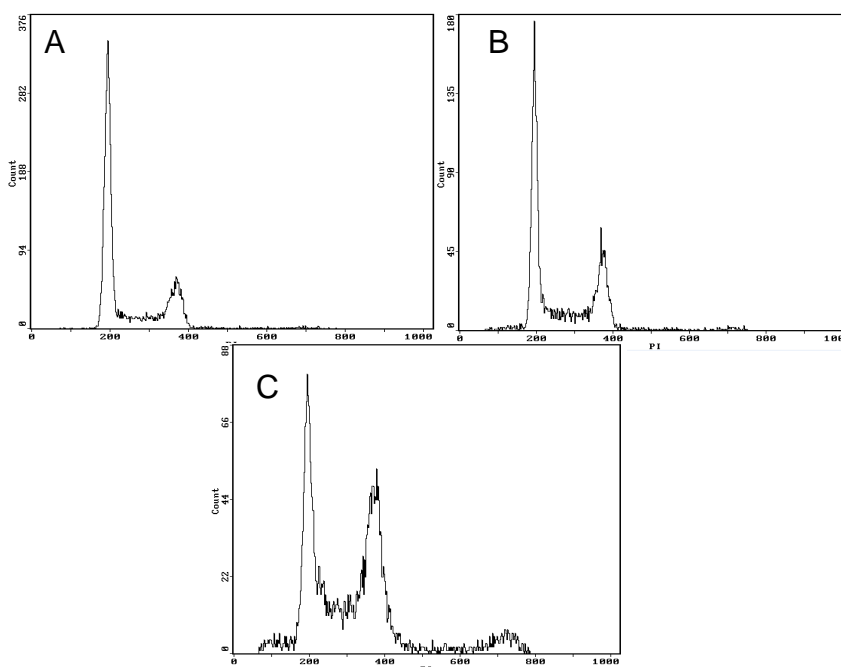


Figura 13 - Exemplos de histogramas obtidos após exposição ao sulforafano durante 48 horas. A - Controlo; B - 5 μ M; C - 10 μ M

Os núcleos que emitem uma fluorescência entre os dois picos têm uma quantidade intermédia de DNA e representam os núcleos na fase S do ciclo celular.

Nestes exemplos de histogramas típicos dos perfis de células nas diferentes condições é visível a variação de células nas diferentes fases, e uma acumulação nítida de células em G_2 com o aumento de concentração de sulforafano (Fig 14).

Usando a citometria de fluxo (FCM) analisou-se a progressão das células da linha em estudo pelas diferentes fases do ciclo celular. Como foi descrito anteriormente usou-se o iodeto de propídio (como fluorocromo estequiométrico para o DNA, e que emite fluorescência na zona do vermelho alaranjado), e a análise foi realizada após as 24 e 48 horas de exposição celular ao sulforafano.

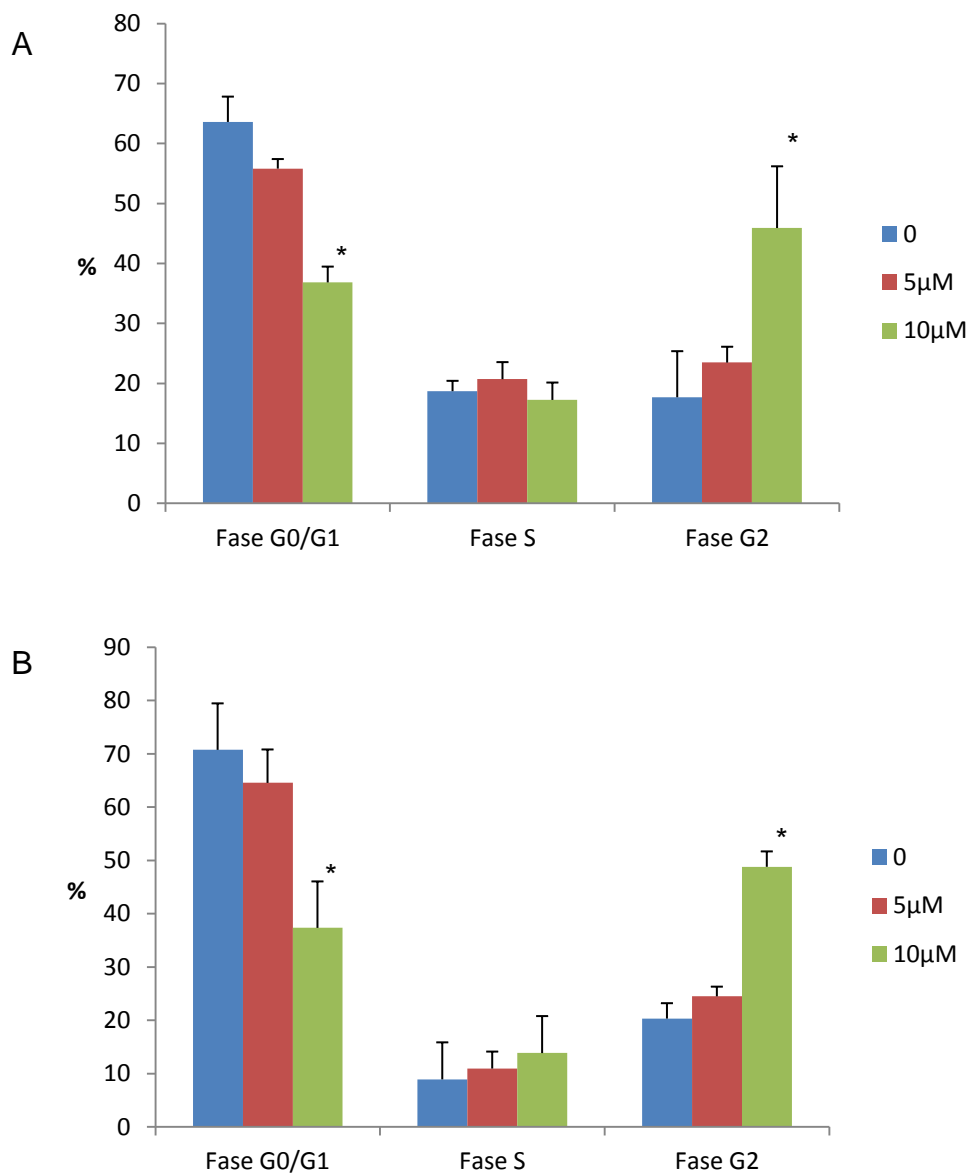


Figura 14 - Resultado do ciclo celular, após (A) 24 e (B) 48 horas de exposição ao sulforafano. Os valores representam a média \pm S.D. O símbolo * indica diferenças significativas entre o controle e as restantes amostras ($p < 0,001$).

A análise ao ciclo celular após 24 horas revelou que a exposição de sulforafano induziu uma acumulação crescente de células na fase G₂, consoante o aumento da concentração do composto: 17,69% ± 8,72 para o controlo; 23,47% ± 6,94, para a concentração de 5µM; e 45,91% ± 2,89 para a concentração de 10µM, embora esta diferença seja apenas estatisticamente significativa para a concentração de 10 µM (Fig 15 A). Após 48 horas foi obtido um resultado semelhante: 20,33 ± 2,48% para o controlo, 24,50 ± 4,27 para a concentração de 5 µM e 48,80 ± 3,83% para a concentração de 10 µM e mais uma vez apenas para a concentração de 10µM se encontraram diferenças estatisticamente significativas (Fig 15 B). Não foram verificadas diferenças estatísticas entre as concentrações para os dois tempos de exposição, o que indica que o tempo de exposição não alterou a acumulação do número de células em G₂ por exposição ao sulforafano.

3.2. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS GENOTÓXICOS DO SULFORAFANO EM CÉLULAS MG-63

3.2.1. Avaliação do ensaio cometa

O ensaio cometa foi realizado, depois da exposição das células da linha MG-63 ao composto sulforafano durante 48 horas. Após este tempo as células foram primeiramente visualizadas no microscópio de fluorescência de modo a observar-se o seu aspeto morfológico e, sobretudo, a formação de cometas.

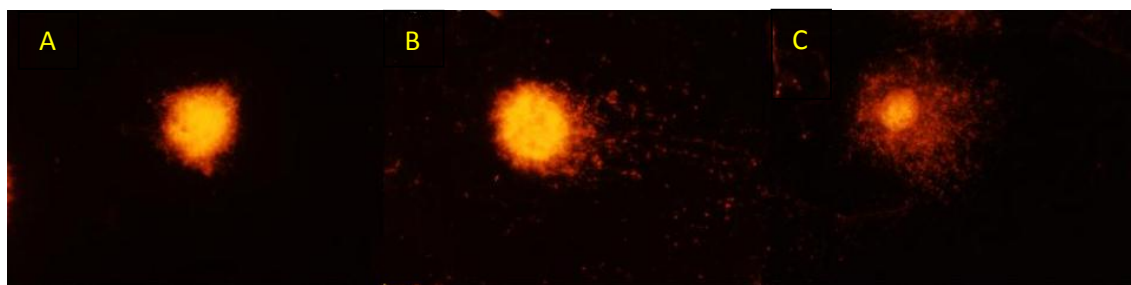


Figura 15 - Imagens do ensaio cometa obtidas após 48 horas de exposição ao sulforafano: A - Controlo; B - 5 µM; C - 10 µM. Ampliação: 1000x.

Verificou-se que quanto maior a concentração de sulforafano, maior o arrastamento de material genético e consequentemente maior o número de quebras de DNA (Fig 16; Tabela 1). Os parâmetros obtidos pelo programa CASPLab revelaram um aumento da % de DNA na cauda para as concentrações de 5 e 10 μM (respetivamente $9,23 \pm 6,62$ a $15,56 \pm 6,28$), relativamente ao controlo.

Tabela 1 - Dados do ensaio cometa após exposição de sulforafano para 48 horas: os valores representam a média \pm S.D. O símbolo * significa que existem diferenças significativas ($p < 0,001$).

	Concentração de Sulforafano (μM)		
	0	5	10
% DNA na Cauda	$0,14 \pm 0,18$	$9,23 \pm 6,62^*$	$15,56 \pm 6,28^*$
Comprimento da Cauda	$8,75 \pm 7,42$	$132,36 \pm 28,86^*$	$207,56 \pm 68,08^*$
Momento da Cauda	$0,02 \pm 0,03$	$14,51 \pm 12,56$	$38,96 \pm 23,02^*$

Os valores de comprimento da cauda foram aqueles onde houve maior variação verificando-se uma grande diferença de valores entre cada uma das concentrações, ($8,75 \pm 7,42$; $132,36 \pm 28,86$; $207,56 \pm 68,08$, para 0, 5 e 10 μM respetivamente). Para os valores de momento da cauda também houve um aumento dos valores conforme o aumento das concentrações ($0,02 \pm 0,03$; $14,51 \pm 12,56$ e $38,96 \pm 23,02$) mas apenas para a concentração de 10 μM é que houve diferenças estatísticas significativas (Tabela 1).

4. Discussão

Como já referido anteriormente, para determinar a eficácia biológica de fitocompostos específicos que têm sido implicados em estudos epidemiológicos tem se utilizado de forma cada vez mais intensiva a experimentação animal em complementaridade com sistemas *in vitro*, reservando os ensaios com sistemas *in vivo* para ensaios de fase mais avançada ou específica. Estes ensaios de eficácia visam determinar a bioatividade dos compostos puros, (e.g. extratos vegetais). Os ensaios podem assim ser usados para testar os potenciais efeitos destes compostos dentro de células, permitindo definir hipóteses de ação/efeitos transponíveis para sistemas mais complexos como os organismos. Nesta fase poderão então usar-se modelos *in vivo*.

Os tipos de modelos utilizados e a abordagem progressiva a partir de culturas de células para sistemas *in vivo*, são em grande parte a base da abordagem adoptada no âmbito da indústria farmacêutica. No entanto, há várias diferenças importantes na avaliação da atividade de um composto com potencial efeito terapêutico, sendo uma delas a necessidade de se estabelecer a sua toxicidade *in vitro/in vivo*, como pré-requisito para estudos em humanos (Traka e Mithen, 2011).

Numerosos estudos têm descrito os efeitos inibitórios de isotiocianatos no crescimento de linhas celulares tumorais humanas em cultura, sendo estes estudos bastante importantes uma vez que o efeito de um composto na proliferação celular é frequentemente usado como uma medida para testar a sua eficiência na prevenção e tratamento do cancro (Shan et al, 2006). Em geral, estes estudos mostram que os isotiocianatos inibem o crescimento celular para pequenas concentrações micromolar (Fimognari et al, 2008).

Neste trabalho, foi avaliada a potencial atividade citotóxica do sulforafano em células tumorais da linha MG-63 de modo a verificar se este composto inibia a viabilidade celular em osteosarcoma.

Os resultados do ensaio MTT demonstraram que houve uma diminuição da viabilidade celular, indicando que a atividade mitocondrial foi afetada na presença do sulforafano durante a exposição de 24 e 48 horas, para a concentração de 10 μ M, respetivamente 33% e 40 % de inibição celular,

relativamente ao controlo. Estes resultados indicam que para esta concentração, a inibição ocorre de modo dose e tempo dependente ou seja quanto maior o tempo de exposição, maior o efeito inibitório provocado pelo sulforafano. Estes dados observados são consistentes com os resultados existentes na literatura para estudos realizados sobre o efeito do sulforafano em linhas de osteosarcoma humano (Kim et al, 2011). Para a concentração 10 μ M de sulforafano e após 48 horas de exposição foi observado uma inibição na viabilidade celular em cerca de 65% para a linha MG-63, e em cerca de 25% para a linha tumoral U2-OS (Kim et al, 2011). Em contrapartida, na linha tumoral de osteosarcoma de roedores LM8 (que possui um grande potencial metástico para os pulmões) observou-se uma diminuição em cerca de 81% da viabilidade celular para exposição a 10 μ M sulforafano durante 48 horas (Matsui et al, 2007). Foram obtidos resultados semelhantes em outras linhas tumorais humanas, tais como do carcinoma do ovário (Bryant et al, 2010), da linha tumoral leucémica (Sestili, et al 2010), do carcinoma da bexiga (Shan et al, 2006) e para a linha tumoral LM8 de osteosarcoma em roedores (Matsui et al, 2007).

Vários estudos realizados (Zhang, 2000 e Zhang, 2001) têm demonstrado de forma evidente que após a absorção de isotiocianatos estes são rapidamente conjugados com tióis intracelulares, tais como a GSH, a cisteína e N-acetilcisteína, sendo depois excretados na urina. O tempo de meia vida dos isotiocianatos acumulados nas células cancerosas da próstata humana LNCaP foi de apenas cerca de 1 h (Zhang, 2004). Por isso, a contínua acumulação intracelular e eficácia biológica apenas é possível quando há uma presença contínua de isotiocianatos para permitir a captação celular frequente destes compostos (Zhang, 2004). É importante referir que quatro voluntários humanos quando alimentados com 200 μ M de isotiocianatos a partir de uma dose de extrato de bróculos, estes foram rapidamente absorvidos e atingiram uma concentração de 0,94-2,27 μ M no plasma, eritrócitos e soro (Zhang, 2004).

No entanto, no presente trabalho apenas foram observados resultados anti proliferativos significativos para a dose de 10 μ M o que significa que terá que ser desenvolvido um melhor sistema de modo a melhorar a absorção do sulforafano por parte das células ou a utilização de injeções intra tumorais de

modo a alcançar-se uma concentração mais elevada de sulforafano no local tumoral. Deve também ser realizado um estudo complementar de modo a investigar os possíveis efeitos secundários de elevadas doses de sulforafano.

A proliferação e diferenciação celular são processos estritamente regulados que têm de ser coordenados de forma muito precisa, de modo a manter a homeostasia nos tecidos. No ensaio desenvolvido nesta dissertação, os resultados da avaliação do ciclo celular, demonstraram que para a concentração de 10 μ M de sulforafano durante a exposição de 24 e 48 horas, houve uma diminuição significativa de células que se encontravam na fase G₀/G₁, e um aumento significativo de células na fase G₂, ou seja paragem do ciclo celular na fase G₂. Estes resultados foram consistentes para outros estudos realizados com células da linha U2-OS e MG-63 onde se verificou que para a mesma concentração de sulforafano ocorria um bloqueio do ciclo celular para a fase G₂ com cerca de 30% das células nesta fase (Kim et al, 2011). Outros exemplos onde ocorre paragem do ciclo celular em G₂ para o sulforafano envolvem células de tumor do cólon, (Gamet-Payraastre, et al 2000), células de tumor da próstata (Cho et al, 2009) e de tumores da mama (Jackson e Singletary, 2004). Estes resultados sugerem que a acumulação de células na fase G₂/M foi causada não só por um aumento na duração da fase G₂, mas por uma paragem completa de muitas células na fase G₂/M. A acumulação de células na fase G₂/M foi acompanhada por uma diminuição na percentagem de células na fase G₀/G₁.

A paragem do ciclo celular na fase G₂/M é observada quando há um defeito na reparação de danos no DNA, na ligação dos centrómeros ao fuso mitótico ou quando ocorre a polimerização dos microtúbulos do fuso e assim uma paragem em G₂ evita que a célula segregue cromossomas defeituosos (Perdigão e Tavares, 2004; Kim et al 2011)

Tendo em conta, estes fatores, estudos realizados por Jackson e Singletary (2004) e Mi et al (2008), identificaram que a tubulina, o principal constituinte dos microtúbulos, é uma proteína alvo de isotiocianatos, onde se inclui o sulforafano, para a inibição do crescimento celular. Estes compostos são eletrófilos que se ligam covalentemente a certos resíduos de cisteína na tubulina

tanto *in vitro* com *in vivo*. Esta ligação induz mudanças conformacionais na tubulina e provoca o colapso dos microtúbulos, o que contribui para a paragem do ciclo celular em G₂/M e consequentemente, apoptose (Mi et al, 2009).

A passagem através do ciclo celular é governada por uma família de complexos de proteína quinase que são controladas, em parte, por quinases dependentes de ciclinas (CDK) e pelos seus parceiros de ativação essencial, as ciclinas (Sherr et al, 1995). Em condições normais, esses complexos são ativados em intervalos específicos, e através de uma série de eventos que resultam na progressão de células através de várias fases do ciclo celular, garantindo assim o crescimento celular normal. Qualquer defeito nesta maquinaria pode causar uma alteração na regulação do ciclo celular que resulta na proliferação celular indesejada e, finalmente, culmina no desenvolvimento de cancro (Pestell et al, 1999). Assim, a regulação da atividade das ciclinas e CDK acabou por ser uma estratégia altamente produtiva para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes anticancerígenos que visam o ciclo celular.

Para uma análise das alterações desta progressão, com base nas ciclinas/CDKs, pode-se considerar que as ciclinas A e B1, juntamente com CDK1 e 2, são as forças motrizes por trás da fase G₂ do ciclo celular, enquanto a p21 induz a paragem do ciclo celular na fase G₁ e G₂ após indução pela p53 (Martinez et al, 1998). Verificou-se que para as células U2-OS houve uma diminuição dos níveis de ciclinas A e B1 e uma diminuição dos níveis de CDKs 1 e 2 para a concentração de 10 e 20 µM e para a concentração de 20µM verificou-se um aumento da expressão da p21. Estes resultados sugerem que a paragem do ciclo celular na fase G₂/M é mediada pela limitação da quantidade de ciclinas e CDKs 1 e 2, que são fatores de regulação essenciais na passagem para a mitose (Kim et al, 2011).

Verificou-se no trabalho de Matsui et al (2007) que, para as células MG-63, o sulforafano induz a paragem do ciclo celular para 24 horas através do aumento da expressão da p21 de forma independente da p53 uma vez que esta está inativada nas células MG-63. Em contrapartida, para as células LM8 a paragem do ciclo celular em G₂ para 24 horas também foi obtida através do aumento da expressão da p21. Estes resultados de Matsui et al (2007) são muito

importantes uma vez que o sulforafano induz a p21 de modo independente da p53 que está inativada em doentes com osteosarcoma (Diller et al, 1990).

O sulforafano é conhecido por induzir quebras de DNA simples, sendo importante notar que o dano no DNA representa, um mecanismo particularmente importante, responsável pela toxicidade de um grande número de medicamentos utilizados na terapia anticancerígena, e este é um campo onde a utilização de isotiocianatos presentes na dieta provenientes da ingestão, em quantidade acima da necessária, está a ser investigado como possível terapia anticancerígena (Fimognari et al, 2006).

Os resultados do ensaio cometa, realizado durante este trabalho, demonstraram que para as concentrações de sulforafano de 5 e 10 μM , estas induzem danos no DNA. Para esta observação foi utilizado o ensaio cometa alcalino, que é um método bastante sensível na deteção de vários tipos de quebras de DNA ao nível de uma única célula (Collins et al, 2008). Estes dados são concordantes com outros trabalhos realizados, que estão relacionados com a indução de quebras de DNA por parte do sulforafano, ou compostos da mesma família em várias linhas tumorais (Visanji et al, 2004; Sestili et al 2010), embora apenas tenham sido encontradas diferenças estatísticas significativas para concentrações iguais ou superiores a 10 μM de isotiocianatos (Ye et al, 2002).

Recentemente foi demonstrado que o sulforafano promove a formação de espécies reativas de oxigénio (ROS), que são conhecidas por induzirem dano no DNA (Singh et al, 2007). Sendo que as mitocôndrias são uma fonte comum de produção de espécies reativas de oxigénio (Sestili et al, 2010) vários estudos foram realizados em células de linhas tumorais, onde se observou que o aumento da produção de ROS por parte do sulforafano, tem como provável localização celular as mitocôndrias (Choi et al, 2008; Xiao et al 2009). No entanto, também foi demonstrado que o sulforafano tem um comportamento ambivalente, uma vez que num trabalho realizado por Shapiro et al (2005), foi demonstrado que o sulforafano não tinha uma atividade selectiva contra células cancerígenas. Este composto foi capaz de provocar a formação de espécies reativas intracelulares, bem como a quebra de DNA tanto em de células transformadas (Jurkat) e não-

transformados (HUVEC), embora para estas últimas em sejam necessárias doses mais elevadas do que as exigidas nas células transformadas (Jurkat). Embora os estudos *in vitro* não prevejam necessariamente os resultados *in vivo*, estes estudos levantam importantes questões relativas à adequação do sulforafano para a quimioprevenção do cancro (Sestili et al, 2010).

Visanji et al, 2004 defende que as quebras de DNA provocadas pelo sulforafano são, mais uma característica pró-carcinogénica, do que um fenómeno anticarcinogénico. Existindo mesmo estudos, que sugerem que os isotiocianatos podem induzir quebras na cadeia de DNA ou ter efeitos mutagénicos (Kassie et al, 2003). Mais recentemente, em ensaios realizados com glucorafenina que é o precursor do sulforafano, foi demonstrado que este composto aumentou a atividade das enzimas de fase I (ativação procarcinogénica), e também se verificou um aumento do stress oxidativo e consequente aumento de dano no DNA (Paolini et al, 2004). Estas substâncias que parecem ser capazes de exercer tanto efeito "pró" e "anti" mutagénico e cancerígeno são chamadas de "mutagénicos de Janus" (Zeiger, 2003). Modelos animais forneceram evidências adicionais para os possíveis efeitos cancerígenos dos isotiocianatos, sugerindo em especial, que os isotiocianatos podem ser de fato co-carcinogénicos como os químicos comuns utilizados em experimentação cancerígena, ao invés de simplesmente se oporem à sua acção como sugerido em estudos anteriores (Hecht, 2000), na verdade, alguns estudos demonstraram que os isotiocianatos podem promover o carcinoma da bexiga em roedores (Sugiura et al, 2003)

Deve-se ter em atenção que as concentrações de sulforafano usadas nestes ensaios são doses acima das recomendadas para a nutrição. Estas observações indicam que estas doses ($> 10 \mu\text{M}$) de sulforafano podem ser consideradas como uma grande promessa para um possível futuro desenvolvimento do sulforafano como agente um quimioterápico e não como um agente quimiopreventivo (Sestili et al, 2010).

Neste contexto, os danos no DNA induzidos por sulforafano merecem consideração como parte dos mecanismos subjacentes na indução da morte de células tumorais, bem como um possível mecanismo adicional responsável por

maximizar os efeitos potencializadores do sulforafano associado a drogas anticancerígenas convencionais (Fimognari et al, 2008).

5. Conclusões e Perspetivas Futuras

O sulforafano em ensaios *in vitro* afectou comprovadamente a viabilidade a proliferação das células de osteosarcoma MG-63. Este efeito traduziu-se num bloqueio em G₂ com inibição da proliferação celular, e num aumento de células com degradação do DNA.

Estes ensaios suportam assim a possibilidade de o sulforafano poder ser um composto de interesse no controlo da proliferação de células tumorais. Mais ensaios deverão ser contudo efetuados para complementar esta assunção:

- Estudos de apoptose (eg por citometria de fluxo, a Anexina ou o TUNEL, ou ainda avaliar a expressão de genes associados a caspases e outras proteínas intervenientes na apoptose)
- Estudos de stress oxidativo (ROS)
- Estudos complementares do ciclo celular (eg. expressão de CDK, ciclinas)
- Outros estudos moleculares de proteínas como a p53, p21, ...

Para além disso, pode ainda avaliar-se o efeito deste composto em ensaios *in vivo*. Estes resultados podem contribuir para, mais tarde, entidades /investigadores elaborarem recomendações sobre a possível utilização deste composto em ensaios clínicos no combate a osteosarcoma. De notar que já estão a ser realizados ensaios clínicos para avaliar o potencial antitumoral do sulforafano, associado a outros tipos de tumores, como o de Zhang (2004).

6. BIBLIOGRAFIA

- Alberts, B. (2002). *Molecular Biology of the Cell*. Harvard: Garland.
- Asakage, M., Tsuno, N., Yamada, J., Okaji, Y., & Kaisaki, S. (2006). Sulforaphane induces inhibition of human umbilical vein endothelial cells proliferation by apoptosis. *Clinica Chimica Acta* , 83-91.
- Aschner, M., Suñol, C., & Bal-Price, A. (2011). *Cell Culture Techniques*. Canada: Humana Press.
- Azevedo, C. (2005). *Biologia Celular e Molecular*. Lisboa: Lidel.
- Bacon, J., Williamson, G., Garner, C., Lappin, G., Langoue, S., & Yongping, B. (2003). Sulforaphane and quercetin modulate PhIP \pm DNA adduct formation in human HepG2 cells and hepatocytes. *Carcinogenesis* , 4-12.
- Bakand, S., Winder, C., Khalil, C., & Hayes, A. (2005). Toxicity Assessment of Industrial Chemicals and Airborne Contaminants: Transition from In Vivo to In Vitro Test Methods: A Review. *Taylor and Francis Inc* , 17:775–787.
- Benayahu, D., Shur, I., Marom, R., Meller, I., & Issakov, J. (2002). Cellular and Molecular Properties Associated With Osteosarcoma Cells. *Journal of Cellular Biochemistry* , 84:108-114.
- Bernas, T., Grégori, G., Asem, E. K., & Robinson, J. P. (2006). Integrating Cytomics and Proteomics. *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology* , 2-13.
- Bilbe, G., Roberts, E., Birch, M., & Evans, D. B. (1996). PCR Phenotyping of Cytokines, Growth Factors and Their Receptors and Bone Matrix Proteins in Human Osteoblast-like Cell Lines. *Elsevier Science Inc.* , 19 437-445.
- Brown, K. K., & Hampton, M. B. (2011). Biological targets of isothiocyanates. *Biochimica et Biophysica Acta* , 888-894.
- Brown, K. K., & Hampton, M. B. (2011). Biological targets of isothiocyanates. *Elsevier B.V.* , 888–894.
- Bryant, C. S., Kumar, S., Chamala, S., Shah, J., Pal, J., Haider, M., et al. (2010). Sulforaphane induces cell cycle arrest by protecting RB-E2F-1 complex in epithelial ovarian cancer cells. *Molecular Cancer* , 9:47.

Cavell, B. E., Alwi, S. S., Donlevy, A., & Packham, G. (2010). Anti-angiogenic effects of dietary isothiocyanates: Mechanisms of action and implications for human health. *Elsevier Inc* , 81: 327–336.

Chiellini, F. (2006). Perspectives on: In Vitro Evaluation of Biomedical Polymers. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* , 21: 252-271.

Cho, S.-D., Li, G., Hu, H., Jiang, C., Kang, K.-S., Lee, Y.-S., et al. (2009). Involvement of c-Jun N-terminal Kinase in G2/M Arrest and Caspase-Mediated Apoptosis Induced by Sulforaphane in DU145 Prostate Cancer Cells. *Nutrition and Cancer* , 52(2), 213–224.

Choi, W., Choi, B., & Choi, Y. (2008). Sulforaphane generates reactive oxygen species leading to mitochondrial perturbation for apoptosis in human leukemia U937 cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy* , 62 637-644.

Chu, W.-F., Wu, D.-M., Liu, W., Wu, L.-J., Li, D.-Z., Xu, D.-Y., et al. (2009). Sulforaphane induces G2–M arrest and apoptosis in high metastasis cell line of salivary gland adenoid cystic carcinoma. *Oral Oncology* , 45 998–1004.

Clarke, J. D., Dashwood, R. H., & Ho, E. (2008). Multi-targeted prevention of cancer by sulforaphane. *Cancer Letters* , 291–304.

Collins, A. R., Oscoz, A. A., Brunborg, G., Gaivão, I., Giovannelli, L., Kruszewski, M., et al. (2008). The comet assay: topical issues. *Mutagenesis* , vol. 23 143–151.

Costa, S., Pina, C., Coelho, P., Costa, C., Silva, S., Porto, B., et al. (2011). Occupational Exposure to Formaldehyde: Genotoxic Risk Evaluation By Comet Assay And Micronucleus Test Using Human Peripheral Lymphocytes. *Journal of Toxicology and Environmental Health* , 1040-1051.

Davies, J. H., Evans, B. A., Jenney, M. E., & Gregory, J. W. (2002). In Vitro Effects of Combination Chemotherapy on Osteoblasts: Implications for Osteopenia in Childhood Malignancy. *Elsevier Science Inc.* , 31 319–326.

De Flora, S., Izzotti, A., D'Agostini, F., Balansky, R. M., Noonan, D., & Albini, A. (2001). Multiple points of intervention in the prevention of cancer and other mutation-related diseases. *Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* , 9–22.

Diller, V., Kassel, J., Nelson, C. E., Gryka, M. A., & Litwak, G. (1990). p53 functions as a cell cycle control protein in osteosarcomas. *Molecular and Cell Biology* , 5772-5781.

Elbarbry, F., & Elrody, N. (2011). Potential health benefits of sulforaphane: A review of the experimental, clinical and epidemiological evidences and underlying mechanisms. *Journal of Medicinal Plants Research* , 5, 473-484.

Fahey, J. W., & Talalay, P. (1999). Antioxidant Functions of Sulforaphane: a Potent Inducer of Phase II Detoxication Enzymes. *Food and Chemical Toxicology* , 37 973-979.

Fahey, J. W., & Zalcmann, A. T. (2000). The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry* , 56 5-51.

Fimognari, C., & Hrelia, P. (2006). Sulforaphane as a promising molecule for fighting cancer. *Mutation Research* , 90–104.

Fimognari, C., Berti, F., Cantelli-Forti, G., & Hrelia, P. (2005). Micronucleus formation and induction of apoptosis by different isothiocyanates and a mixture of isothiocyanates in human lymphocyte cultures. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* , 582 1-10.

Fimognari, C., Lenzi, M., & Hrelia, P. (2008). Chemoprevention of Cancer by Isothiocyanates and Anthocyanins: Mechanisms of Action and Structure-Activity Relationship. *Current Medicinal Chemistry* , 15, 440-447.

Fimognari, C., Nüsse, M., Cesari, R., Iori, R., Cantelli-Forti, G., & Hrelia, P. (2002). Growth inhibition, cell cycle arrest and apoptosis in human T-Cell Leukemia by the isothiocyanates sulforaphane. *Carcinogenesis* , 23 581-586.

Fotakis, G., & Timbrell, J. A. (2005). In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Elsevier Ireland Ltd* , 171–177.

Freshney, R. I. (2010). *Culture of animal cells : a manual of basic technique and specialized applications*. University of Glasgow: John Wiley & Sons, Inc.

Gamet-Payrastre, L., Pengfei, L., & Lumeau, S. (2000). Sulforaphane, a Naturally Occurring Isothiocyanate, Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis in HT29 Human Colon Cancer Cells. *Cancer Research* , 60, 1426–1433.

Guimarães, A., Rocha, R., Cunha, I., Guimarães, G., Carvalho, A., Camargo, B., et al. (2010). Prognostic impact of adenomatous polyposis coli gene expression in osteosarcoma of the extremities. *European Journal of Cancer* , 46 3307-3315.

Haina, Y., Shanjing, Y., Yuru, Y., Gongnian, X., & Qi, Y. (2010). Antioxidant Activity of Isothiocyanate Extracts from Broccoli. *Chinese Journal of Chemical Engineering* , 18: 312-321.

Halkier, B. A., & Gershenzon, J. (2006). *Biology and Biochemistry of Glucosinolates*. Palo Alto, CA: The Annual Review of Plant Biology.

Halkier, B. A., & Gershenzon, J. (2006). Biology and Biochemistry of Glucosinolates. *The Annual Review of Plant Biology* , 57: 303-333.

Hayes, J., Kelleher, M., & Eggleston, I. (2008). The cancer chemopreventive actions of phytochemicals derived from glucosinolates. *European journal of nutrition* , 73-88.

Hecht, S. S. (2000). Inhibition of carcinogenesis by isothiocyanates. *drug metabolism reviews* , 32 395–411.

Higdon, J. V., Delage, B., Williams, D. E., & Dashwood, R. H. (2007). Cruciferous Vegetables and Human Cancer Risk: Epidemiologic Evidence and Mechanistic Basis. *Pharmacological Research* , 55(3): 224–236.

Hodgson, E. (2004). *A textbook of modern toxicology*. North Carolina State University: Wiley Interscience.

Jackson, S. J., & Singletary, K. W. (2004). Sulforaphane Inhibits Human MCF-7 Mammary Cancer Cell Mitotic Progression and Tubulin Polymerization. *Nutrition and Cancer* , 134: 2229–2236.

Jakubikova, J., Cervi, D., Ooi, M., Kim, K., Nahar, S., Klippel, S., et al. (2011). Anti-tumor activity and signaling events triggered by the isothiocyanates, sulforaphane and phenethyl isothiocyanate, in multiple myeloma. *Ferrata Storti Foundation* , 1170-1179.

Jha, A. N. (2008). Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. *Oxford University Press* , vol. 23 no. 3 pp. 207–221.

Johnson, I. (2007). Phytochemicals and cancer. *The Proceedings of the Nutrition Society* , 207-15.

Jones, S., & Brooks, J. (2006). Modest induction of phase 2 enzyme activity in the F-344 rat prostate. *BMC Cancer* , 6:62-71.

Juge, N., Mithen, R. F., & Traka, M. (2007). Molecular basis for chemoprevention by sulforaphane: a comprehensive review. *Cellular and Molecular Life Sciences* , 64 1105 – 1127.

Karmakar, S., Weinberg, M. S., Banik, N. L., Patel, S. J., & Ray, K. (2006). Activation of multiple molecular mechanisms for apoptosis in human malignant glioblastoma t98g and u87mg cells treated with sulforaphane. *Neuroscience* , 1265-80.

Kassie, F., Laky, B., Gminski, R., Mersch-Sundermann, V., & Scharf, G. (2003). Effects of garden and water cress juices and their constituents, benzyl and phenethyl isothiocyanates, towards benzo(a)pyrene-induced DNA damage: a model study with the single cell gel electrophoresis/Hep G2 assay. *Chemico-Biological Interactions* , 142 285-296.

Kim, M.-R., Zhou, L., Park, B.-H., & Kim, J. R. (2011). Induction of G2/M arrest and apoptosis by sulforaphane in human osteosarcoma U2-OS cells. *Molecular Medicine Reports* , 1-6.

Kumaravel, T. S., Vilhar, B., Faux, S. P., & Jha, A. N. (2007). Comet Assay measurements: a perspective. *Cell Biol Toxicol* , 25 53–64.

Kumaravel, T. S., Vilhar, B., Faux, S. P., & Jha, A. N. (2007). Comet Assay measurements: a perspective. *Springer Science + Business Media* , 25:53–64.

Kushad, M., Brown, A., Kurilich, A., Juvik, J., Klein, B., Wallig, M., et al. (1999). Variation of glucosinolates in vegetable crops of Brassica oleracea. *Journal of agricultural and food chemistry* , 1541-8.

Lampe, J. W., & Peterson, S. (2002). Brassica, Biotransformation and Cancer Risk: Genetic Polymorphisms Alter the Preventive Effects of Cruciferous Vegetables. *The Journal of Nutrition* , 0022-3166/02.

Lévesque, M., Martineau, C., Jumarie, C., & Moreau, R. (2008). Characterization of cadmium uptake and cytotoxicity in human. *Toxicology and Applied Pharmacology* , 308–317.

Loureiro, J., & Santos, C. (2004). Aplicação da Citometria de Fluxo ao estudo do Genoma Vegetal. *Métodos em Biotecnologia* , 18-29.

Mahéo, K., Morel, F., & Langouët, S. (1997). Inhibition of Cytochromes P-450 and Induction of Glutathione S-Transferases by Sulforaphane in Primary Human and Rat Hepatocytes. *Cancer Research* , 57:3649-3652.

Mahéo, K., Morel, F., Langouët, S., & Ferrec, E. (1997). Inhibition of Cytochromes P-450 and Induction of Glutathione S -Transferases by Sulforaphane in Primary Human and Rat Hepatocytes. *Cancer* , 3649-3652.

Martinez, J., Stratagoules, E., & LaRue, J. (1998). Different bile acids exhibit distinct biological effects: the tumor promoter deoxycholic acid induces apoptosis and the chemopreventive agent ursodeoxycholic acid inhibits cell proliferation. *Nutrition and Cancer* , 31 111-118.

Masters, J. R. (2000). *Animal Cell Culture*. 3rd Floor Research Laboratories, University College London: Practical Approach.

Matsui, T.-A., Murata, H., Sakabe, T., Sowa, Y., Horie, N., Nakanishi, R., et al. (2007). Sulforaphane induces cell cycle arrest and apoptosis in murine osteosarcoma cells in vitro and inhibits tumor growth in vivo. *Oncology Reports* , 18: 1263-1268.

McCabe, P. F., & Leaver, C. J. (2000). Programmed cell death in cell cultures. *Kluwer Academic Publishers* , 44: 359–368.

McKenna, D. J., McKeown, S. R., & McKelvey-Martin, V. J. (2008). Potential use of the comet assay in the clinical management of cancer. *Oxford University Press* , vol. 23 no. 3 pp. 183–190.

Mi, L., Gun, N., & Chung, F.-L. (2009). Aggresome-like structure induced by isothiocyanates is novel proteasome-dependent degradation machinery. *Biochemical and Biophysical Research Communications* , 388 456–462.

Mi, L., Xiao, Z., Hood, B. L., Dakshanamurthy, S., Wang, X., Govind, S., et al. (2008). Covalent Binding to Tubulin by Isothiocyanates. *Journal of Biological Chemistry* , 283 32, pp. 22136–22146.

Mohseny, A., Machado, I., Cai, Y., Schaefer, K.-L., Serra, M., Hogendoorn, P., et al. (2011). Functional characterization of osteosarcoma cell lines provides representative models to study the human disease. *Laboratory Investigation* , 1–11.

Nossoni, F. (2008). Single-Cell Gel Electrophoresis (Comet Assay): Methodology , Potential Applications , and Limitations in Cancer Research. *Biotechnology* , 30-35.

Paolini, M., Perocco, P., Canistro, D., Valgimigli, L., Pedulli, G. F., Iori, R., et al. (2004). Induction of cytochrome P450, generation of oxidative stress and in vitro cell-transforming and DNA-damaging activities by glucoraphanin, the bioprecursor of the chemopreventive agent sulforaphane found in broccoli. *Mutagenesis* , vol.25 no.1 pp.61±67.

Pautke, C., Schieker, M., Tischer, T., Kolk, A., Neth, P., Mutschler, W., et al. (2004). Characterization of Osteosarcoma Cell Lines MG-63, Saos-2 and U-2 OS in Comparison to Human Osteoblasts. *Anticancer Research* , 24 3743-3748.

Perdigão, J., & Tavares, Á. (2004). Ciclo Celular e novas terapias contra o cancro. *Boletim de Biotecnologia* , 7-14.

Perocco, P., Bronzetti, G., Canistro, D., & Valgimigli, L. (2006). Glucoraphanin, the bioprecursor of the widely extolled chemopreventive agent sulforaphane found in broccoli, induces Phase-I xenobiotic metabolizing enzymes and increases free radical generation in rat liver. *Mutation Research* , 595 125–136.

Pestell, R., Albanese, C., & Reutens, A. (1999). The cyclins and cyclin-dependent kinase inhibitors in hormonal regulation of proliferation and differentiation. *Endocr Rev* , 501-534, 1999.

Peter, C., & Rakesh, J. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* , 249-257.

Serafimova, R., Gatnik, M., & Worth, A. (2010). Review of QSAR Models and Software Tools for Predicting Genotoxicity and Carcinogenicity. *Institute for Health and Consumer Protection* , 1-49.

Sestili, P., Paolillo, M., Lenzi, M., Colombo, E., Vallorani, L., Casadei, L., et al. (2010). Sulforaphane induces DNA single strand breaks in cultured human cells. *Mutation Research* , 65-73.

Shan, Y., Sun, C., Zhao, X., Wu, K., Cassidy, A., & BAO, Y. (2006). Effect of sulforaphane on cell growth, G0/G1 phase cell progression and apoptosis in human bladder cancer T24 cells. *International Journal Of Oncology* , 29: 883-888.

Shapiro, T., Fahey, J., & Dinkova-Kostova, A. (2005). Safety, tolerance, and metabolism of broccoli sprout glucosinolates and isothiocyanates: a clinical phase I study. *Nutr. Cancer* , 55 53–62.

Sherr, C., & Roberts, J. (1995). Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* , 1149-1163.

Silva, T. L., Reis, A., Hewitt, C., & Roseiro, J. C. (2004). Citometria de fluxo - Funcionalidade celular on-line em. *Métodos em Biotecnologia* , 32-40.

Singh, B. K., & Kumar, R. (2008). *Principles of Animal Cell Culture*. India: International Book Distributing Co.

Singh, N., McCoy, M., Tice, R., & Edward, S. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research* , 184-191.

Singh, S., Herman-antosiewicz, A., Singh, A., Lew, K., Srivastava, S., Kamath, R., et al. (2004). Sulforaphane-induced G 2 / M Phase Cell Cycle Arrest Involves Checkpoint Kinase 2-mediated Phosphorylation of Cell Division Cycle 25C. *Biochemistry* , 25813-25822.

Sklar, L. A. (2005). *Flow Cytometry for Biotechnology*. 198 Madison Avenue, New York: Oxford University Press.

Skupinska, M.-K., Stypulkowski, R., Lubelska, K., & Kasprzycka-Guttman, T. (2009). Sulforaphane and Its Analogues Inhibit CYP1A1 and CYP1A2 Activity Induced by Benzo[a]pyrene. *Biochem Molecular Toxicology* , 23,1-11.

Sugiura, S., Ogawa, k., Hirose, M., Takeshita, F., Asamoto, M., & Tomoyouki, S. (2003). Reversibility of proliferative lesions and induction of non-papillary tumors in rat urinary bladder treated with phenylethyl isothiocyanate. *Carcinogenesis* , 24: 574-553.

Ta, H., Dass, C., Choong, P., & Dunstan, D. (2009). Osteosarcoma treatment: state of the art. *Cancer Metastasis Rev* , 28:247–263.

Talalay, P. (2000). Chemoprotection against cancer by induction of Phase 2 enzymes. *BioFactors* , 5-11.

Talalay, P., Fahey, J. W., Holtzclaw, W. D., Prestera, T., & Zhang, Y. (1995). Chemoprotection against cancer by Phase 2 enzyme induction. *Toxicology Letters* , 173-179.

Tavares, A. A., & Tavares, J. M. (2009). *Princípios Gerais de Culturas de Células e Citometria de Fluxo para Avaliação dos Efeitos da Radiação Ionizante*. Porto: Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto.

Tice, R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartm, A., Kobayashi, H., et al. (2000). Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and molecular mutagenesis* , 206-21.

Topè, A. M., & Rogers, P. F. (2009). Evaluation of protective effects of sulforaphane on DNA damage caused by exposure to low levels of pesticide mixture using comet assay. *Journal of Environmental Science and Health* , 44 657-662.

Topè, A., & Rogers, P. (2009). Evaluation of protective effects of sulforaphane on DNA damage caused by exposure to low levels of pesticide mixture using comet assay. *ournal of environmental science and health. Part. B, Pesticides, food contaminants, and agricultural wastes* , 657-62.

Traka, M. H., & F. Mithen, R. (2011). Plant Science and Human Nutrition: Challenges in Assessing Health-Promoting Properties of Phytochemicals. *Plant Science and Human Nutrition* , 23 2483–2497.

Traka, M. H., & Mithen, R. F. (2011). Plant Science and Human Nutrition: Challenges in Assessing Health-Promoting Properties of Phytochemicals. *American Society of Plant Biologists* , 23: 2483–2497.

Traka, M., & Mithen, R. (2009). Glucosinolates, isothiocyanates and human health. *The Phytochemical Society of Europe* , 8:269–282.

Tran, S.-L., Puhar, A., Ngo-Camus, M., & Ramarao, N. (2011). Trypan Blue Dye Enters Viable Cells Incubated with the Pore-Forming Toxin HlyII of *Bacillus cereus*. *Plos One* , Volume 6 | Issue 9 | e22876.

Van Meir, E., Hadjipanayis, C., Norden, A., Shu, H.-K., Wen, P., & Olson, J. (2010). The Avenue to a Cure for Malignant Glioma. *CA Cancer J Clin* , 60 166–193.

Verhoeven, D., Goldbohm, A., Van Poppel, G., Verhagen, H., & Piet, V. d. (1996). Epidemiological Studies on Brassica Vegetables and Cancer Risk. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* , 733-748.

Visanji, J., Duthie, S., Pirie, L., Thompson, D., & Padfield, P. (2004). Dietary Isothiocyanates Inhibit Caco-2 Cell Proliferation and Induce G2/M Phase Cell Cycle Arrest, DNA Damage, and G2/M Checkpoint Activation. *The American Society for Nutritional Sciences* , 134:3121-3126.

Wang, L., Okaichi, K., Ihara, M., & Okumura, Y. (1998). Sensitivity of anticancer drugs in Saos-2 cells transfected with mutant p53 varied with mutation point. *Anticancer Res* , 18: 321-325.

Wasson, G. R., McKelvey-Martin, V. J., & Downes, C. S. (2008). The use of the comet assay in the study of human nutrition and cancer. *Oxford University Press* , vol. 23 no. 3 pp. 153–162.

Weiss, E., Herhaus, C., Klimo, K., Bartsch, H., & Gerha, C. (2001). Nuclear Factor B Is a Molecular Target for Sulforaphane-mediated Anti-inflammatory Mechanisms . *Biochemistry* , 32008-32015.

Weyermann, J., Lochmann, D., & Zimmer, A. (2005). A practical note on the use of cytotoxicity assays. *International Journal of Pharmaceutics* , 369–376.

Xiao, D., Powolny, A., Antosiewicz, J., Hahm, E.-R., & Bommarreddy, A. (2009). Cellular Responses to Cancer Chemopreventive Agent D, L-Sulforaphane in Human Prostate Cancer Cells Are Initiated by Mitochondrial Reactive Oxygen Species. *Pharmaceutical Research* , 26 1729-1738.

Yao, H., Xu, W., Shi, X., & Zhang, Z. (2011). Dietary Flavonoids as Cancer Prevention Agents. *Journal of Environmental Science and Health, Part C* , 29:1, 1-31.

Ye, L., & Zhang, Y. (2001). Total intracellular accumulation levels of dietary isothiocyanates determine their activity in elevation of cellular glutathione and induction of phase 2 detoxification enzymes. *Carcinogenesis* , 22 1987-1992 .

Ye, L., Dinkova-Kostova, A., Wade, K., Zhang, Y., Shapiro, T., & Talalay, P. (2002). Quantitative determination of dithiocarbamates in human plasma, serum, erythrocytes and urine: pharmacokinetics of broccoli sprout isothiocyanates in humans. *Clinica Chimica Acta* , 316 43-53.

Yoxall, V., Kentish, P., Coldham, N., Kuhnert, N., Sauer, M. J., & Ioannides, C. (2005). Modulation of hepatic cytochromes P450 and phase II enzymes by dietary doses of sulforaphane in rats: Implications for its chemopreventive activity. *International Union Against Cancer* , 117, 356–362.

Zeiger, E. (2003). Illusions of safety: antimutagens can be mutagens,. *Mutation Research* , 543 181-189.

Zhang, C. C. (2002). High cellular accumulation of sulphoraphane, a dietary anticarcinogen, is followed by rapid transporter-mediated export as a glutathione conjugate. *Biochemical Society* , 364, 301±307.

Zhang, Y. (2004). Cancer-preventive isothiocyanates: measurement of human exposure and mechanism of action. *Mutagenesis* , 555 173–190.

Zhang, Y. (2001). Molecular mechanism of rapid cellular accumulation of anticarcinogenic isothiocyanates. *Mutagenesis* , 22 425-431.

Zhang, Y. (2000). Role of glutathione in the accumulation of anticarcinogenic isothiocyanates and their glutathione conjugates by murine hepatoma cells. *Carcinogenesis* , 21 1175-1182.

Zhang, Y., Munday, R., Jobson, H. E., Munday, C. M., Lister, C., Wilson, P., et al. (2006). Induction of GST and NQO1 in Cultured Bladder Cells and in the Urinary Bladders of Rats by an Extract of Broccoli (*Brassica oleracea italica*) Sprouts. *J. Agric. Food Chem* , 54 9370-9376.